

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
HIDROXIAPATITA CON POTENCIAL USO COMO NANO
FERTILIZANTE

Tesis

Que presenta EDUARDO ARÓN FLORES HERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Mayo 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

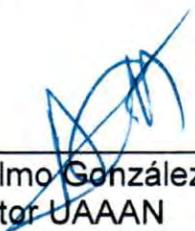


SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
HIDROXIAPATITA CON POTENCIAL USO COMO NANO
FERTILIZANTE

Tesis

Que presenta EDUARDO ARÓN FLORES HERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA


Dr. Anselmo González Torres
Director UAAAN


PhD. Ricardo Hugo Lira Saldívar
Director Externo CIQA

Torreón, Coahuila

Mayo 2020

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
HIDROXIAPATITA CON POTENCIAL USO COMO NANO
FERTILIZANTE

Tesis

Elaborada por EDUARDO ARÓN FLORES HERNÁNDEZ como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Anselmo González Torres
Asesor principal



Dr. Alejandro Moreno Reséndez
Asesor



Dr. Mario García Carrillo
Asesor



Dra. Norma Rodríguez Dimas
Asesor



PhD. Ricardo Hugo Lira Saldivar
Asesor



Dra. Leticia R. Gaytán Alemán
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente
Subdirector de Postgrado

Dedicatoria

A mis Padres

Jose Luis Flores Prado y Amalia A. Hernández Elías

Con mucha gratitud les dedico este logro, a ti Papa, por que con tu guía y tu ejemplo me mostraste un camino que quise seguir, tu trabajo y esfuerzo fueron modelo que me motivaron para intentar parecerme a ti, estuviste presente siempre al pendiente mas sin embargo ahora ya no estas aquí, por eso espero que allá en el cielo te encuentres contento por esta etapa que concluí. A ti Mama, por tu gran esfuerzo y dedicación, por que fue difícil seguir sola pero no te rendiste, por que con tu infinito apoyo y amor incondicional salimos adelante, por que fuiste ejemplo de perseverancia, lucha, rectitud y responsabilidad, por que siempre confiaste en mi.

A mi esposa Alejandra

Por ser mi persona favorita, por ser la mujer de mi vida con la que encontré el amor y por ser también un apoyo incondicional, tus opiniones y puntos de vista honestos e inteligentes lograron mejorar diversos aspectos tanto de mi vida como de mi trabajo, además de tu siempre actitud positiva que me motiva a seguir adelante, a pesar de los problemas que nos ha tocado enfrentar. Para ti mi amor y admiración, seguiremos avanzando, sin soltarnos.

A mis hijos

En quienes veo la principal inspiración para seguir creciendo y mejorando en todo aspecto, por que me han apoyado a pesar de todo el tiempo de convivencia que les he robado para dedicarlo a este proyecto, por ustedes haré que este esfuerzo valga la pena. Se merecen lo mejor y espero entregarles solo lo mejor de mi.

Agradecimientos

A Dios

“Recordare el amor del señor y lo alabaré por todo lo que hizo por nosotros” Isaias 63:7.
“Pero por la gracia de Dios soy lo que soy, y su gracia no ha sido en vano para conmigo, antes he trabajado mas que todos ellos, pero no yo, sino la gracia de Dios conmigo” 1° de Corintios 15:10.

A mis Padres y familia

Por todo el apoyo independientemente de las circunstancias.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, mi “Alma Mater”, por permitirme ser parte de su comunidad estudiantil y concluir una etapa muy importante de mi vida.

Al Departamento de Suelos, y a cada uno de sus integrantes, ya que, sin su ayuda, este proyecto no se habría llevado a cabo.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos, así como las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto de investigación.

A el Ph.D. Ricardo Hugo Lira Saldivar, por aceptarme como parte de su equipo de tutorados, por la confianza e interés mostrados desde el principio en este proyecto, por la guía y enseñanzas adquiridas durante mi estancia en CIQA.

A el personal administrativo de la UAAAN UL

A todas y cada una de las secretarias, quienes realizan un trabajo invaluable y de quienes he recibido guía, consejo, orientación y asesoramiento, pero sobre todo su amistad, gracias.

Faltan muchas personas por agradecer, amigos, compañeros y familiares, a todos y cada uno de ustedes mi mas sincero y profundo agradecimiento, por que cada uno de manera directa o indirecta, contribuyo en algún sentido a la satisfactoria conclusión de este proyecto, por su presencia en mi vida... Gracias!!!

Aceptación de los artículos para su publicación

Artículo 1. Publicado

Revista Mexicana de Ingeniería Química

Publicación de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A. C. Depto. de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340 México, D. F. Tel. 5844648 al 51. FAX 58 044900. E-mail: amidiq@xanum.uam.mx

Editores en Jefe:

Dr. J. Alberto Ochoa Tapia

Dr. E. Jaime Vernon Carter

Dr. Tomás Viveros García

Responder a:

Dr. Tomás Viveros García

E-mail: tvig@xanum.uam.mx;

amidiq@xanum.uam.mx

Dr. E.A. Flores Hernández

UAAAn UL

e-mail: efloher@uasan.edu.mx

México, D. F., a 13 de Junio de 2019

Manuscrito No. RMIQ-OJS 523

Estimado(a) Dr. Flores Hernández

Le informo que la *Revista Mexicana de Ingeniería Química* ha aceptado su artículo

Título del Trabajo: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO CALCÍCO Y EFECTO DEL TIPO DE AGITACIÓN EN LA MORFOLOGÍA DE LAS PARTICULAS

Autores: E.A. Flores-Hernández, R.H. Lira-Saldivar, R. Acosta-Ortiz, B. Méndez-Arguello, J.I. García-López, E. Díaz-Barriga-Castro, A. González-Torres, M. García-Carrillo

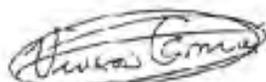
para su publicación.

En breve le haremos llegar las galeras correspondientes para su revisión.

Agradezco su participación y colaboración y hacemos una extensa invitación para que sometan futuros manuscritos a la RMIQ.

Sin más por el momento me despido de usted.

Atentamente:



Dr. Tomás Viveros García

Editor de RMIQ

Artículo 2. Enviado

The screenshot shows a webmail interface for TELMEX. The browser address bar displays <https://micorreo.telmex.com/#/mail/list/msg>. The user is logged in as efloher@uaaaan.edu.mx. The interface includes a search bar, a navigation sidebar with folders like 'Bandeja de entrada' (1), 'Borradores', 'Enviado', 'Correo no deseado', 'Papelera', and 'Carpetas', and a main content area. The email subject is '[NS] Acuse de recibo de envío'. The sender is 'Nova Scientia' <nova_scientia@delasalle.edu.mx>. The date is 12/02/2019 03:31PM and the recipient is 'Master en ciencias Eduardo Arón Flores Hernández' <efloher@uaaaan.edu.mx>. The body text reads: 'Apreciable Master en ciencias Eduardo Arón Flores Hernández: Gracias por enviar el manuscrito "Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de Raphanus sativus" a Nova Scientia. Con nuestro sistema de gestión editorial en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial. URL del manuscrito: <http://novascientia.delasalle.edu.mx/ojs/index.php/Nova/author/submission/2285> Nombre de usuario/a: edulag Una vez completado el proceso de arbitraje, le haremos llegar la resolución tomada por el Consejo Editorial. SOLICITAMOS NOS RECOMIENDE A 5 POSIBLES EVALUADORES DE SU TRABAJO AJENOS A SU INSTITUCIÓN. Le agradecemos su valiosa contribución para la Revista Nova Scientia. Nova Scientia ISSN 2007 - 0705 Tel. 01 477 214 3900 ext. 6305 <http://novascientia.delasalle.edu.mx/>

Artículo 3. Patente registrada

MX/a/2019/013018

gob.mx

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

REPRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD DE REGISTRO DE PATENTE ENVIADA A TRAVÉS DEL PORTAL DE ACCESO A SERVICIOS ELECTRÓNICOS (PASE).

Homoclave del formato	Folio
IMPI-00-009	Folio: MX/E/2019/074893

Fecha de publicación en el DOF	Fecha de solicitud del trámite
24 05 2018	31 10 2019

Datos generales de la solicitud

<input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente Normal <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial Especifique cual: <input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial	Expediente: MX/a/2019/013018 ID Solicitud: 18767 Fecha: 31/10/2019 03:22:16
--	---

Datos del (de los) solicitante(s)

Personas físicas	Personas morales
CURP:	RFC: CIQ7611022G2
Nombre(s):	Denominación o razón social: CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Primer apellido:	Nacionalidad: MÉXICO
Segundo apellido:	Teléfono (Lada, Número, Extensión): 8444389830
Nacionalidad:	Correo electrónico: propiedad.industrial@ciqa.edu.mx
Teléfono (Lada, Número, Extensión):	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo
Correo electrónico:	<input type="radio"/> Continúa en anexo

Índice general

Contenido

Lista de Figuras	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
Introducción	1
Hipótesis	3
Justificación	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	4
Revisión de Literatura	5
1. El Desarrollo de la nanotecnología	5
1.1 Uso de la nanotecnología en el área agrícola	7
1.2 Nanotecnología y agricultura sustentable.	10
1.3 Nanofertilizantes inteligentes o de liberación lenta.	13
2. Antecedentes de la nano hidroxiapatita	14
2.1 Características y composición de la hidroxiapatita	14
2.2 La nano hidroxiapatita en la medicina	15
2.3 Aplicación de nano hidroxiapatita en sistemas agropecuarios	17
3. Fitotoxicidad generada por nanopartículas	18
3.1 Fitotoxicidad generada por nano hidroxiapatita	21
Referencias	23
Artículos	29
Artículo 1. (Aceptado)	29
Artículo 2. (Enviado)	43
Artículo 3. (Patente registrada)	63
CONCLUSIÓN GENERAL	67

Lista de Figuras

Figura 1. Factores que influyen en la absorción, transporte y penetración de las nanopartículas en las plantas. Fuente: Pérez-de-Luque (2017).....	10
Figura 2. Aplicaciones agrícolas de la nanotecnología. (A) Incremento de la productividad mediante el uso de nanopesticidas y nanofertilizantes; (B) Mejoramiento de la calidad de los suelos usando nanozeolitas e hidrogeles; (C) Estimulación del crecimiento de planta usando nanomateriales (SiO ₂ , TiO ₂ y nanotubos de carbono); (D) Mediante el uso de nanosensores inalámbricos se puede monitorear el suelo. Fuente: Fraceto <i>et al.</i> (2016).....	11

Resumen

En este trabajo se presenta un proceso económico y eficiente para preparar nanopartículas de hidroxiapatita (nHAp). El objetivo de este estudio fue sintetizar, caracterizar y determinar el efecto del tipo de agitación en la producción y morfología de las nHAp, así como la aplicación de éstas en semillas de *Raphanus sativus*, para determinar su efecto en germinación y crecimiento de plántulas. La síntesis se realizó mediante precipitación química, aplicando agitación mecánica y magnética. Las imágenes del microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) indica que la agitación mecánica produjo ~27% de partículas con diámetro entre 15-20 nm, mientras que la agitación magnética produjo ~31%. Los tratamientos aplicados en semilla (mg L^{-1}) fueron: 25 (T2), 50 (T3), 100 (T4), 200 (T5), 500 (T6) y 1000 (T7). Las semillas de control (T1) se trataron con agua destilada. Se observó que la nHAp afectó significativamente ($p \leq 0.01$) el vigor de la germinación con (T6), al mostrarse un efecto inhibitorio, ya que esta variable se redujo en 11.83% comparado con (T1). Para la variable germinación, el (T7) mostró una reducción de 14.44% contra (T1). En cambio, con (T5), la longitud de plúmula y radícula revelaron un efecto promotor de crecimiento, con una diferencia positiva de 9.52 y 7.59%, respectivamente, contra (T1). Se considera que la nHAp tiene potencial comercial como nanofertilizante, al observarse que a menor tamaño de nanopartícula se requiere menor cantidad de nHAp para generar un efecto promotor del crecimiento en plántulas de rábano.

Palabras clave: Caracterización, hidroxiapatita, morfología, nanofertilizante, nanopartículas, nanotecnología, *Raphanus sativus*,

Abstract

This paper presents an economical and efficient process to prepare nanoparticles of hydroxyapatite (nHAp). The objective of this study was to synthesize, characterize and determine the effect of the type of agitation on the production and morphology of the nHAp, as well as the application of these in *Raphanus sativus* seeds, to determine their effect on germination and seedling growth. The synthesis was carried out by chemical precipitation, applying mechanical and magnetic agitation. The images of the transmission electron microscope (TEM) indicate that mechanical agitation produced ~27% of particles with a diameter between 15-20 nm, while magnetic agitation produced ~31%. The treatments applied in seed (mg L⁻¹) were: 25 (T2), 50 (T3), 100 (T4), 200 (T5), 500 (T6) and 1000 (T7). Control seeds (T1) were treated with distilled water. It was observed that nHAp significantly affected ($p \leq 0.01$) the germination vigor with (T6), as it showed an inhibitory effect, since this variable was reduced by 11.83% compared to (T1). For the germination variable, (T7) showed a reduction of 14.44% against (T1). In contrast, with (T5), the length of the formula and radicle revealed a growth promoting effect, with a positive difference of 9.52 and 7.59%, respectively, against (T1). It is considered that nHAp has commercial potential as a nanofertilizer, observing that a smaller nanoparticle size requires a smaller amount of nHAp to generate a growth promoting effect in radish seedlings.

Key words: characterization, hydroxyapatite, morphology, nanofertilizer, nanoparticles, nanotechnology, *Raphanus sativus*

Introducción

Los fertilizantes desempeñan un papel fundamental para mejorar la productividad de los cultivos. Sin embargo, las eficiencias en el uso de nutrientes de los fertilizantes convencionales apenas superan el 30–35, 18–20 y 35–40% para N, P y K, manteniéndose estos valores constantes durante las últimas décadas (Subramanian *et al.*, 2015).

La materia prima para la fabricación industrial de los fertilizantes fosfatados solubles en agua es la roca fosfórica, la cual también es utilizada para la aplicación directa en la agricultura como fuentes de fósforo. Roca fosfórica es el nombre común comercial de unos 300 fosfatos de diferentes calidades conocidos en el mundo, también conocida como apatita (Zapata y Roy, 2007). Los compuestos fosfatados se presentan de forma natural en el suelo principalmente como fosfatos de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Al^{3+} , los cuales son poco solubles. Aunque la cantidad total de fósforo en el suelo puede ser alta, en la mayoría de los casos no está disponible para la absorción de la planta (Rincón y Gutiérrez, 2012).

El fósforo es extremadamente reactivo químicamente y siempre existe como fosfato mineral en la naturaleza; Se encuentran al menos 170 minerales diferentes. Estos minerales varían mucho en su solubilidad y tienden a transformarse de formas poco solubles a formas cada vez más insolubles con el paso del tiempo. En consecuencia, P en el suelo es el elemento más inmóvil, inaccesible e invariable de todos los nutrientes. Estas características hacen que el P sea resistente a la lixiviación en la mayoría de los suelos, pero al mismo tiempo causan una deficiencia generalizada de P para la producción agrícola (Holford, 1997). La importancia del fósforo en las plantas radica en su participación como componente estructural de las células, así como su rol en la transferencia de energía (Covacevich *et al.*, 1998). Debido a la baja solubilidad de la roca fosfórica, Alston y Chin (1974) propusieron reducir el tamaño de partícula de la misma para su aplicación en cultivos, con lo cual demostraron que se mejoraba su efectividad agronómica.

De acuerdo con la idea anterior, con el uso de la nanotecnología se podría reducir a un diminuto tamaño las partículas de hidroxiapatita, con lo que se aumentaría la proporción de área - volumen, y en consecuencia estas nanopartículas podrían

disuélvase más rápidamente que sus contrapartes a granel. La reducción del tamaño de partículas conteniendo elementos nutritivos para la planta, constituye la idea base para la fabricación de nano fertilizantes (Giroto *et al.*, 2015; Raliya *et al.*, 2017).

Los nano fertilizantes (NFs) aparecen como alternativa que puede mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo y mejorar la capacidad de conservación del agua y los fertilizantes, mejorando el rendimiento de los cultivos. Esta mejora en la conservación de fertilizantes puede reducir en gran medida la contaminación del suelo y de las aguas subterráneas (Teng *et al.*, 2018).

El empleo de nanopartículas (NPs) en las actividades agropecuarias, acuña el término nano-agricultura. Diversos estudios en esta nueva disciplina han demostrado que las NPs pueden tener un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de las plántulas (Li y Huang, 2014; Salachna *et al.*, 2019). El éxito de las NPs puede deberse al aumento en el área superficial de adsorción de éstas (Elfeky *et al.*, 2013). Esta propiedad puede mejorar la eficiencia en el intercambio de cationes o aniones, entre la solución del suelo y las nanopartículas. De esta forma, las NPs retienen nutrientes que libera posteriormente, cuando pueden ser utilizados por la planta (Noppakundilokrat *et al.*, 2015; Giroto *et al.*, 2017).

Por otro lado, existen problemas asociados con algunas sales de fosfato solubles, muy utilizadas en la agricultura como fertilizantes de fósforo (P), ya que causan la eutrofización del agua superficial. Sin embargo, las nanopartículas de apatita sintética podrían hipotéticamente suministrar suficiente P a los cultivos con menos movilidad en el ambiente y con menos biodisponibilidad para las algas en comparación con las contrapartes solubles (Liu y Lal, 2014).

Hipótesis

¿El tipo de agitación en la reacción de precipitación química húmeda para fabricar hidroxiapatita, afectará el rendimiento de la reacción y la morfología de las partículas producidas?

Justificación

La sobre población mundial y el consumo de alimentos que ésta necesita está generando una explotación sin precedente de los recursos naturales. En la actualidad existen cerca de mil millones de personas que sufren de desnutrición crónica mientras que la tierra, el agua y la biodiversidad se degradan a escala mundial (ONU, 2019). Aunado a los problemas anteriormente señalados, la fertilización de los cultivos es otro factor que se debe considerar, ya que limita la producción agrícola, pues los cultivos absorben sólo una fracción del fertilizante aplicado que oscila entre 10 y 60%. En México, en los últimos 40 años, el consumo de fertilizantes N-P-K se ha incrementado de 5×10^4 Mg a más de 5.5×10^6 Mg (Cabriales *et al.*, 2002). Con la realización del presente estudio se pretende aplicar la nanotecnología en el sector agrícola a fin de evaluar una posible mejora en el rendimiento de los cultivos, ya que las nanopartículas de HAp tienen propiedades fisicoquímicas distintas a las partículas de tamaños macroscópicos, así como un área superficial mucho más grande que las hace más reactivas. Por otro lado, el tamaño nano podría facilitar la penetración de estas partículas por las células vegetales, mejorando la absorción.

Objetivo general

- Analizar la efectividad del tipo de agitación para producir NPs de HAp y el potencial de éstas en la promoción del vigor de germinación de semillas y en el crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*.

Objetivos específicos

- Establecer si existe alguna diferencia en la morfología y tamaño de NPs de HAp fabricadas por medio de una reacción de precipitación química húmeda empleando agitación mecánica contra agitación magnética.
- Conocer el efecto de la aplicación de las NPs de HAp sobre la germinación de semillas.
- Determinar si existe alguna diferencia en respuesta del vigor de la semilla a la aplicación de NPs de HAp en *Raphanus sativus*.
- Evaluar si a diferentes dosis aplicadas de NPs de HAp sobre las semillas de *Raphanus sativus* se obtiene un efecto promotor o fitotóxico en procesos relacionados con la germinación y el crecimiento de las plántulas.

Revisión de Literatura

1. El Desarrollo de la nanotecnología.

Aunque el término nanociencia es nuevo, parte de la tecnología no lo es ni es exclusiva de la manipulación humana. Por ejemplo, las nanopartículas de carbono se han utilizado para el refuerzo de neumáticos durante más de 100 años, las proteínas a nanoescala han sido parte de las vacunas desde principios del siglo XX, el color rojo rubí de los vitrales fabricados en la Edad Media se debe a la presencia de nanopartículas de oro atrapadas en la matriz de vidrio, en el mar, la brisa desprende nanopartículas de agua con sal y las exhalaciones de volcanes emiten partículas de ceniza a escala nano (Ashby *et al.*, 2009).

Los registros históricos en la aplicación de la nanotecnología se remontan a 4500 años atrás, cuando una matriz cerámica se reforzó con nano fibras de asbesto natural y los artesanos de Mesopotamia decoraron sus macetas con NPs de oro y plata (Heiligtag y Niederberger, 2013).

Sin embargo, del pasado existen tres ejemplos con materiales a escala nano que se deben destacar, por ser procesos accidentales con resultados sobresalientes:

- I. Los mayas mezclaron y cocinaron el tinte natural índigo con una arcilla porosa que tiene huecos de tamaño nano que encapsularon el color y produjeron el tinte conocido como azul maya, el cual ha perdurado por miles de años sin perder su coloración.
- II. La copa de Licurgus, exhibida en el British Museum en Londres, está hecha con vidrio contaminado con nanopartículas de oro y plata. La característica más notable de esta copa es que, bajo condiciones normales de iluminación externa, el vidrio parece verde, pero cuando se ilumina desde adentro, adquiere un color rojo intenso.
- III. El acero de Damasco, que se hiciera célebre por las espadas del Ejército de Saladino en el siglo XII, tiene propiedades sorprendentes de dureza y elasticidad que se explicaron recientemente al comprobar que en su proceso de elaboración por accidente se produjeron nanotubos de carbono que reforzaron su estructura (García-Guerrero, 2019).

Con el tiempo, se lograría dar explicación a estos fenómenos a través de la idea de las NPs, la cual fue concebida y desarrollada, por primera vez, por Michael Faraday en 1857, en una explicación científica de las propiedades de éstas en su trabajo sobre las "Relaciones experimentales del oro y otros metales con la luz". La idea de la manipulación a nanoescala, está vinculada a un discurso del premio Nobel Richard Feynman en 1959, en una reunión de la American Physical Society. El origen griego de la palabra "nano" significa "enano", y el término fue introducido por primera vez por el profesor Norio Taniguchi de la Universidad de Ciencias de Tokio (Gouda *et al.*, 2019).

Las nanopartículas pueden provenir de fuentes naturales como erupciones volcánicas, polvo meteórico, meteorización y acción microbiana sobre la materia orgánica del suelo. Las fuentes antropogénicas incluyen la producción de nanopartículas diseñadas para una serie de aplicaciones por métodos fisicoquímicos o biológicos con la ayuda de microbios. Las NP diseñadas pueden dividirse en cuatro categorías: materiales a base de carbono (nanotubos de carbono de pared simple), NP a base de metales (puntos cuánticos, nano oro, nano plata, etc.), dendritas (polímeros de nano tamaño compuestos por unidades ramificadas sintetizadas para función química específica) y compuestos (hechos de dos o más sustancias) (Kumar *et al.*, 2018).

Sin embargo, el avance de la nanotecnología se ha potencializado en las últimas tres décadas debido a la invención de muchas técnicas/instrumentos que han permitido la manipulación y observación del nanomundo. Hoy en día, los nanomateriales (NM) y/o NPs se utilizan para muchas aplicaciones en la vida diaria, como en los campos de la electrónica, catálisis, óptica, biología y medicina (Deshmukh, 2019). La nanotecnología opera en la base misma de la materia, en el primer nivel de organización de los sistemas vivos y antropogénicos. Los beneficios potenciales son grandes, pero también lo son los riesgos percibidos (Roco, 2005). La nanotecnología puede estar en todas partes. Se puede encontrar en neumáticos, pasta de dientes, bloqueador solar, raquetas y pelotas de tenis, camisetas, pantalones, reproductores de CD e incluso superficies de

bañeras, inodoros y lavabos. Toda esta gama de productos ofrece nuevas propiedades para mejorar los bienes de consumo, al ser más compactos, más livianos, más rápidos, más baratos, resistentes al agua, a la suciedad y las manchas. La humanidad se dirige hacia un nanofuturo, hacia un mundo con vida eterna y recursos inagotables (Hullmann, 2007).

En su definición más estricta de la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de USA, la nanotecnología se refiere a estructuras de tamaño aproximadamente de 1-100 nm, en al menos una dimensión. A pesar de esta restricción de tamaño, la nanotecnología se refiere comúnmente a estructuras que tienen un tamaño de hasta varios cientos de nanómetros y que se desarrollan mediante ingeniería “Top Down” (de arriba hacia abajo), lo cual significa partir de una macromolécula y dividirla hasta la nanoescala, o “Bottom up” (de abajo hacia arriba) que significa ensamblar átomos del material hasta el tamaño deseado (Farokhzad y Langer, 2009).

La nanotecnología es multidisciplinaria y se necesita la participación de especialistas de las diferentes áreas de la ciencia como físicos, ingenieros, biólogos, médicos, etc., para poder analizar la información extraída del nanomundo: los físicos, por ejemplo, aportan dimensiones y propiedades, los químicos, composición, reactividad y enlaces, los biólogos toxicidad, interacción con células y microorganismos, así como la estructura fisicoquímica final (Soriano *et al.*, 2018).

1.1 Uso de la nanotecnología en el área agrícola

Al exponer las aplicaciones agrícolas de la NT, es necesario estudiar cómo las plantas absorben y captan las nanopartículas, cómo se mueven dentro de la planta, cómo interactúan con la célula vegetal y cuán importantes son los elementos nutritivos que necesitan las plantas para su desarrollo, a continuación, se detalla la importancia de los macronutrientes NPK:

El nitrógeno (N) constituye del uno al cuatro por ciento de la materia seca de las plantas, es un nutriente vital y esencial para el crecimiento de éstas. El nitrógeno

forma parte de la estructura de las proteínas y los ácidos nucleicos, así como de otros compuestos esenciales para los procesos de crecimiento de las plantas, incluida la clorofila y muchas enzimas. También media la utilización de fósforo, potasio y otros elementos en las plantas. Las cantidades óptimas de estos elementos en el suelo no pueden utilizarse de manera eficiente si el nitrógeno es deficiente. Cuando hay deficiencia de nitrógeno, el crecimiento se reduce (Onasanya *et al.*, 2009).

Por su parte, el fósforo (P) juega un papel importante en muchos procesos fisiológicos que ocurren dentro de una planta en desarrollo y en proceso de maduración. Sin un suministro adecuado de P, una planta no puede alcanzar su máximo potencial de rendimiento. El fósforo juega un papel importante en el almacenamiento y la transferencia de energía en las plantas de un cultivo. El difosfato de adenosina (ADP) y el trifosfato de adenosina (ATP), producidos a través de la respiración y la fotosíntesis, son compuestos con grupos de fosfato de alta energía que impulsan la mayoría de los procesos fisiológicos en las plantas, incluida la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de ácidos nucleicos de proteínas y el transporte de iones a través de las membranas celulares. El fósforo es una parte esencial de la estructura del nucleótido de trifosfopiridina (DPN y TPN). El DPN y el TPN actúan como portadoras de electrones o hidrógeno entre los sitios de reacciones de oxidación y reducción, que ocurren en la respiración, la fermentación y la fotosíntesis (Fageria, 2016).

El potasio (K) es un elemento nutritivo esencial para todos los organismos vivos. Los vegetales necesitan cantidades elevadas de este nutriente siendo semejante al requerimiento de nitrógeno. El K cumple un rol importante en la activación de un número de enzimas (conociéndose más de 60 activadas por este catión), que actúan en diversos procesos metabólicos tales como fotosíntesis, síntesis de proteínas y carbohidratos; también tiene incidencia en el balance de agua y en el crecimiento meristemático. Al participar de estos procesos metabólicos el K actúa favoreciendo el crecimiento vegetativo, la fructificación, la maduración y la calidad de los frutos. Las plantas obtienen el K del suelo que proviene de la meteorización

de los minerales, de la mineralización de los residuos orgánicos o el que proviene de los abonos y fertilizantes (Conti, 2000).

Una vez que los macronutrientes NPK penetran en la planta, existen dos formas de moverse a través de los tejidos: el apoplasto y el simplasto (Figura 1). Estas rutas de desplazamiento al interior de la planta son seguidas también por las NPs. El transporte apoplástico tiene lugar fuera de la membrana plasmática a través de los espacios extracelulares, las paredes celulares de las células adyacentes y los vasos del xilema, mientras que el transporte simplásico implica el movimiento de agua y sustancias entre el citoplasma de las células adyacentes a través de estructuras especializadas denominadas plasmodesmos y placas de tamiz. La vía apoplástica es importante para el movimiento radial dentro de los tejidos de las plantas y permite que los NM alcancen el cilindro central de la raíz y los tejidos vasculares, para un mayor movimiento hacia arriba de la parte aérea. Una vez dentro del cilindro central, las nanopartículas pueden moverse hacia la parte aérea a través del xilema, siguiendo la corriente de transpiración. Sin embargo, alcanzar el xilema a través de la raíz implica cruzar una barrera a la vía apoplástica, la Banda de Caspary, que debe hacerse siguiendo una vía sintética a través de células endodérmicas. De hecho, algunos NM pueden detenerse y acumularse en la franja de Caspary (Pérez-de-Luque, 2017).

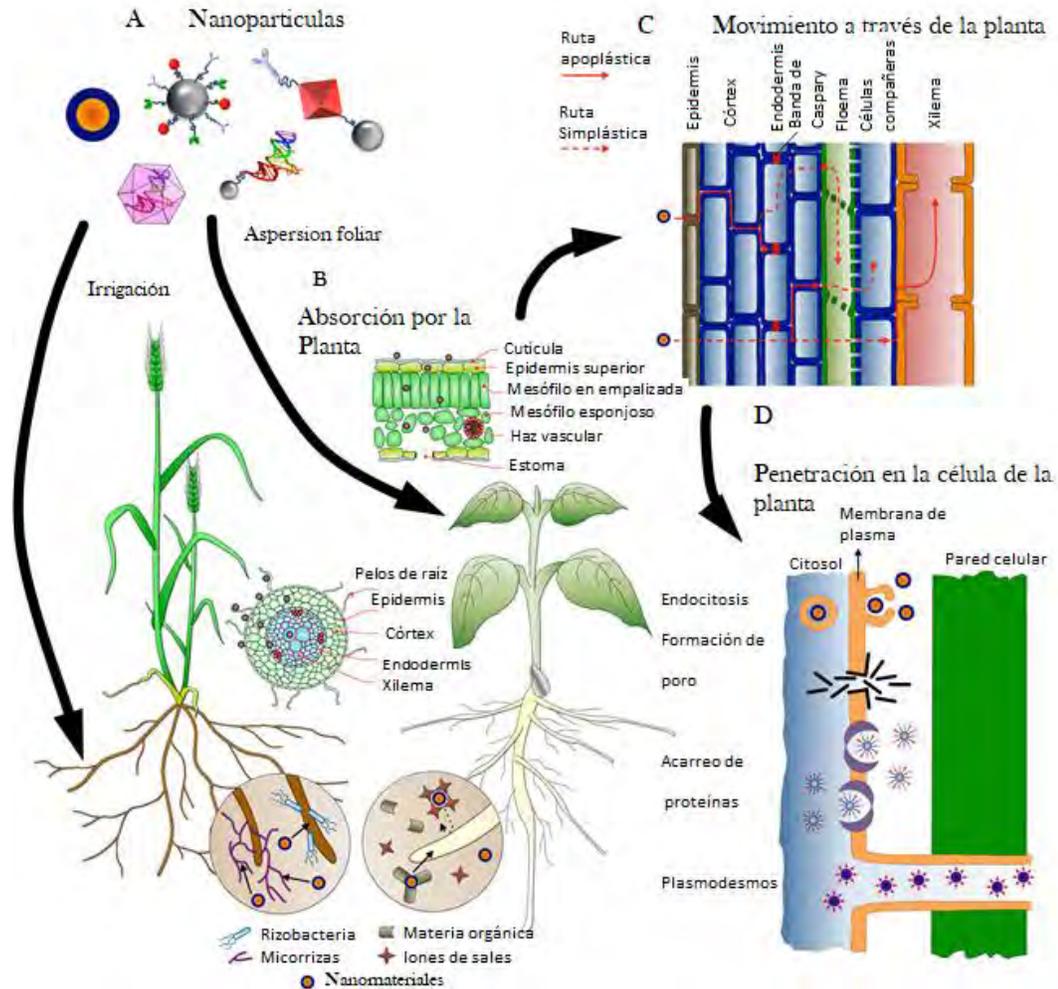


Figura 1. Factores que influyen en la absorción, transporte y penetración de las nanopartículas en las plantas. Fuente: Pérez-de-Luque (2017).

1.2 Nanotecnología y agricultura sustentable.

Las propiedades únicas de los materiales a nanoescala los convierten en candidatos idóneos para el diseño y desarrollo de herramientas novedosas en apoyo de una agricultura sostenible, la amplia gama de aplicaciones potenciales de la nanotecnología ha propiciado una intensa investigación tanto académica como industrial. Algunas de estas posibles aplicaciones se describen en la Figura 2 (Fraceto *et al.*, 2016).

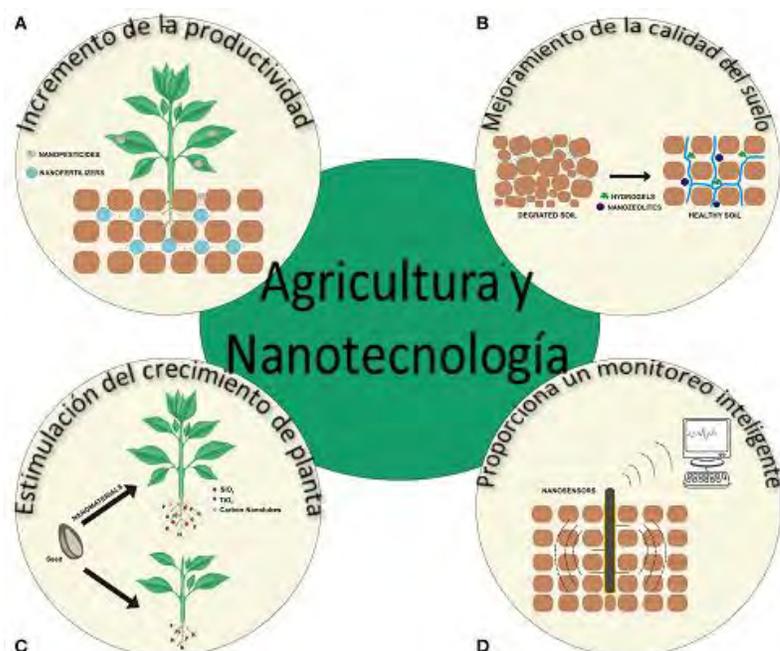


Figura 2. Aplicaciones agrícolas de la nanotecnología. (A) Incremento de la productividad mediante el uso de nanopesticidas y nanofertilizantes; (B) Mejoramiento de la calidad de los suelos usando nanozeolitas e hidrogeles; (C) Estimulación del crecimiento de planta usando nanomateriales (SiO_2 , TiO_2 y nanotubos de carbono); (D) Mediante el uso de nanosensores inalámbricos se puede monitorear el suelo. Fuente: Fraceto *et al.* (2016)

No existe un área de actividad humana más esencial para la sociedad que un sistema sostenible de agricultura, alimentación y recursos naturales. El sistema de producción agrícola existente ha proporcionado un suministro de alimentos abundante, asequible y seguro, y muchos productos industriales y de consumo enfrentan el enorme desafío de satisfacer las necesidades de una creciente población mundial de aproximadamente 9 a 10,000 millones de personas en 2050 con la necesidad de proporcionar aproximadamente un 25–70% más de alimentos que los que se producen en la actualidad (Scott *et al.*, 2018).

Ante tal necesidad, los fertilizantes inorgánicos han sido clave para la producción de cultivos durante décadas, por lo que se ha hecho un uso intensivo de los mismos, con el fin de incrementar los rendimientos de los cultivos agrícolas, sin embargo, su aplicación excesiva deteriora la salud del suelo y causan problemas de contaminación del ambiente, por otro lado, el uso excesivo de los nanoplaguicidas están relacionados directamente con el incremento de la

resistencia de insectos y microorganismos fitopatógenos a estos productos. La nanotecnología ofrece avances tecnológicos importantes capaces de mejorar las prácticas agrícolas, detección rápida de enfermedades en los cultivos, así como el diseño de NFs, los cuales han demostrado que mejoran la productividad de los cultivos y reducen las pérdidas de nutrientes al mejorar la capacidad de las plantas para absorber los mismos (Saldivar *et al.*, 2018).

Gracias a las ventajas anteriormente señaladas de la NT y NFs, hemos entrado en una etapa de transformación de los sectores tradicionales de la alimentación y la agricultura. Sin embargo, la NT se sigue desarrollando y se han inventado numerosos y novedosos NM capaces de mejorar la calidad y seguridad de los alimentos, el crecimiento de los cultivos y el monitoreo de las condiciones ambientales, a través de nanosensores, nanoplaguicidas y nuevas formulaciones de NFs (He *et al.*, 2019).

Otras ventajas confirmadas del desarrollo de los NM es que pueden mejorar con éxito la inocuidad de los alimentos al mejorar la eficacia del envasado, el tiempo de conservación y el valor nutricional de los alimentos como aditivos sin cambiar el sabor y las características físicas de los productos alimenticios (Bajpai *et al.*, 2018).

Por otro lado, los NM son parte clave en la fabricación de nanosensores, utilizados comúnmente para medir la contaminación que existe en suelos y agua, gracias a la rapidez con que arrojan resultados en el monitoreo ambiental. Otros ejemplos de este tipo de tecnología de nano detección son: biosensores, sensores electroquímicos, sensores ópticos entre otros dispositivos, los cuales se convertirán en los principales instrumentos para detectar metales pesados a gran escala (Prasad *et al.*, 2017).

El uso de NM en los diferentes sectores de la industria, incluyendo la agricultura, comprende diferentes variedades de compuestos. De acuerdo con el volumen de mercado, las categorías que más se comercializan contienen NM inorgánicos no metálicos, NM basados en carbono, NPs metálicas y materiales poliméricos orgánicos. Según los registros, a nivel mundial la comercialización anual de NM

es de aproximadamente 11.5 millones de toneladas, con un valor de mercado de casi \$ 20 mil millones de dólares (Vishwakarma *et al.*, 2018).

1.3 Nanofertilizantes inteligentes o de liberación lenta.

Las aplicaciones y beneficios de la nanotecnología en el sector agrícola han atraído una considerable atención, particularmente por la invención de productos únicos como los nanopesticidas y nanofertilizantes (Kah *et al.*, 2018). Algunos de los objetivos de la nanotecnología agrícola que necesitan atención son el desarrollo de nanocompuestos que puedan transportar agentes activos como nutrientes, fertilizantes y pesticidas (Kim *et al.*, 2018).

Los nanofertilizantes se sintetizan o modifican a partir de fertilizantes tradicionales, fertilizantes a granel o se extraen de diferentes partes vegetativas o reproductivas de la planta mediante diferentes métodos químicos, físicos, mecánicos o biológicos con la ayuda de la nanotecnología. Estos nanocompuestos pueden ser formulados con algún tipo de recubrimiento, donde el compuesto a escala nano puede quedar encapsulado dentro del recubrimiento en escala sub nano y regular la liberación de nutrientes (Banotra *et al.*, 2017).

Los fertilizantes formulados como nanocompuestos con recubrimiento polimérico tienen el potencial de mejorar la eficiencia del uso de nutrientes. Rop *et al.* (2018) formularon un compuesto fertilizante de liberación lenta [Slow Release Fertilizer (SRF, por sus siglas en inglés)], incorporando nHAp y fertilizantes solubles en agua como la urea, fosfato di amónico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ y sulfato de potasio (K_2SO_4) en una matriz de celulosa-injerto-poli (acrilamida). Como resultado se observó un contenido significativamente mayor de nitrógeno mineral (MN, por sus siglas en inglés, Mineral Nitrogen) en las primeras cuatro semanas en los fertilizantes convencionales (CF, por sus siglas en inglés, Conventional Fertilizer) en comparación con los tratamientos SRF y el control. Sin embargo, el P disponible alcanzó su punto máximo en la octava semana en todos los tratamientos y se mantuvo constante en las semanas 12 y 16. La disponibilidad de P en las SRF aumentó con el aumento del contenido de P soluble y la disminución del contenido de nHAp.

2. Antecedentes de la nano hidroxiapatita

2.1 Características y composición de la hidroxiapatita

En 1788, Wener acuñó el término “Ap atite” (del griego, "engañar"), para identificar un grupo de minerales con estructuras semejantes, pero composiciones diferentes, los cuales por su color eran fácilmente confundidos con gemas preciosas. Dichos minerales cristalizan en forma de prisma rómbico hexagonal (LeGeros y LeGeros, 2003; Farokhi *et al.*, 2018).

A la hidroxiapatita se le considera como un material cerámico, y las NPs basadas en materiales cerámicos han ganado recientemente más atención en el campo de la administración de fármacos, estas NPs pueden diseñarse para poseer propiedades de interés, como por ejemplo propiedades eléctricas (ferroeléctricas y diaeléctricas), mecánicas (propiedades piezoeléctricas, ultra alta dureza), magnéticas (superparamagnéticas) y ópticas (fototérmicas, propiedades de electroluminiscencia). Esta versatilidad en el diseño es poco común en NPs metálicas o poliméricas (Mozafari, 2014).

La hidroxiapatita (HAp), con fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, pertenece a los fosfatos cálcicos, o para ser más precisos a los ortofosfatos cálcicos. El fosfato cálcico se encuentra de manera natural en el cuerpo humano, pero también en la naturaleza en forma de roca mineral. Este mineral también puede ser sintetizado, usando una relación molar Ca/P que puede variar de 0.5 hasta 2. La HAp es el componente principal del hueso y durante los últimos 30 años se ha estudiado intensamente. En 1769 se descubrió que los huesos están compuestos por fosfato cálcico. En 1920 se utilizó el fosfato tricálcico (TCP) por primera vez como biomaterial, en una cirugía realizada por el cirujano estadounidense F.H. Albee, para reparar un defecto en el hueso de un conejo. Posteriormente se realizaron pruebas en humanos, usando la HAp principalmente en implantes óseos, limitándose en gran medida a las partes del esqueleto que no soportan mucha carga debido a sus pobres propiedades mecánicas (Pawłowski, 2018).

2.2 La nano hidroxiapatita en la medicina

La ciencia ha tenido grandes avances en áreas como la química, la medicina y los materiales, esto ha generado una nueva era de diagnóstico y terapia de enfermedades. Estas ciencias en conjunto deben de colaborar para el suministro eficiente de medicamentos y agentes terapéuticos que sean seguros, sin riesgo de interacción no deseada en el organismo de las personas. Los científicos químicos y de materiales han dedicado sus esfuerzos para desarrollar medicamentos combinados con materiales biológicamente seguros, estudiando el efecto de diferentes tamaños, formas, composiciones químicas y propiedades fisicoquímicas (Mohammadi *et al.*, 2017).

La nHAp es un mineral cerámico que genera un gran interés debido a que ofrece de forma natural una excelente biocompatibilidad, osteoconductividad, bioactividad y no toxicidad (Miroiu *et al.*, 2010), características ideales que son aprovechadas en varias aplicaciones biomédicas, por ejemplo, ingeniería de tejido óseo (Zhou y Lee, 2011), reparación de hueso (Shepherd *et al.*, 2012), regeneración de hueso (Thomson *et al.*, 1998), fijación de implantes en hueso (Kjeld, 1993), y recubrimiento de implantes metálicos para hueso (Habibovic *et al.*, 2004), ya que los huesos son un sistema complejo compuestos por HAp y fibras de colágeno tipo I. La HAp corresponde al 70% del hueso, 20% corresponde al colágeno y alrededor de un 10% es agua (Szcześ *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que los fosfatos de calcio nanoestructurados (nFC) también nombrados hidroxiapatita, debido a su alta área superficial específica, tienen una alta capacidad de atrapar en su estructura fármacos, genes y proteínas, además de un alto rendimiento de liberación controlada de estos mismos elementos. Por esta razón son reconocidos como nanotransportadores prometedores por la industria farmacéutica (Qi *et al.*, 2019).

Investigaciones recientes muestran la mejora en los tratamientos terapéuticos contra el cáncer a través de sistemas de administración de fármacos dirigidos a tumores, mediante el uso de nHAp, una tecnología cada vez más utilizada. La solubilidad de la HAp es sensible al pH, esta característica la hace excelente

candidata para localizar un tumor y liberar un fármaco, ya que el tumor tiene valores de pH ácido. Esta capacidad de respuesta al pH permite que las nHAp también se pueden aplicar para la administración intracelular de agentes sensibles a la degradación, como las proteínas. En el caso de los lisosomas que poseen ambientes ácidos, la nHAp puede suministrar proteínas a las células al degradarse, esto promueve el escape endo-lisosómico de las proteínas dentro del lisosoma de las células (Mohammadi *et al.*, 2017).

Sun *et al.* (2018) desarrollaron nanorods de HAp cargados con doxorubicina (DOX) y ácido fólico (FA) (DOX @ HAP-FA) para un tratamiento antitumoral. Los nanorods inhibieron la proliferación de células diana. Más importante aún, en pruebas con ratón que había desarrollado tumor, el tratamiento con DOX @ HAP-FA demostró una excelente inhibición del crecimiento de éste, sin observarse efectos secundarios aparentes durante el tratamiento. Estos resultados sugieren que DOX @ HAP-FA puede ser un agente nano terapéutico prometedor para el tratamiento efectivo del cáncer *in vivo*.

Li *et al.* (2013) también utilizaron HAp con fines anticancerígenos al desarrollar un proceso simple para sintetizar gelatina anfifílica con núcleo de óxido de hierro, recubierto por una capa de HAp, aplicando eficientemente este compuesto como un sistema de liberación de fármacos anti-cáncer. Šupová (2015) realizó una revisión de documentos que evidencian el creciente interés en mejorar el rendimiento biológico de la HAp para aplicaciones biomédicas, a través de sustituciones iónicas, los cuales generaban cambios estructurales y morfológicos, pudiendo afectar sus características químicas. Banerjee *et al.* (2018) desarrollaron un nano compuesto híbrido con erbio, HAp y quitosano, resultando en un potente antimicrobiano contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, inhibiendo por contacto su crecimiento en placas de agar. Matinfar *et al.* (2019) fabricaron fibras porosas de quitosano y carboximetilcelulosa reforzadas con fosfato cálcico bifásico y trifásico para ingeniería del tejido óseo. Sus resultados mostraron que las fibras trifásicas fueron más efectivas para reforzar las estructuras óseas.

2.3 Aplicación de nano hidroxapatita en sistemas agropecuarios

Desde los inicios de la Revolución Verde impulsada en la década de 1960, el uso de fertilizantes inorgánicos ha aumentado notablemente, contribuyendo a un aumento significativo de la producción mundial de alimentos. Sin embargo, las reservas existentes de roca fosfórica que se utilizan para fabricar los fertilizantes de P son finitos, habiéndose estimado que las reservas se habrán de agotar en los próximos 50–125 años (Cordell y White, 2015). Se pronostica que el pico global esperado en la producción de fósforo ocurrirá alrededor de 2030. El problema actual en la industria de fertilizantes radica en que la calidad de la roca fosforica que queda en los yacimientos esta disminuyendo y los costos de producción están aumentando. Sin embargo, esta problemática del futuro suministro de fósforo recibe poca o ninguna atención internacional. (Cordell *et al.*, 2009).

Como una alternativa para mitigar la posible escases futura de fósforo, se ha propuesto el uso de la roca fosfórica sintetizada en laboratorio (hidroxapatita) como nanopartícula aplicada directamente al cultivo, ya que puede aumentar la disponibilidad del fósforo en la planta, porque se evita su fijación en el suelo. A escala nanométrica, las propiedades físicas y químicas de los materiales son diferentes a las del material a granel. El uso de nano fertilizantes para la liberación y control preciso de nutrientes permitirá el desarrollo de una agricultura sostenible y compatible con el ambiente (Banotra *et al.*, 2017). De acuerdo con Marchiol *et al.* (2019) la principal ventaja de usar nHAp o nFC como nanofertilizante con respecto a otros NM, es que son ampliamente reconocidos por su biocompatibilidad y biodegradabilidad intrínseca. Por lo tanto, cuando se considera su aplicación en campo abierto, el perfil biológico seguro de la nHAp no debe plantear ninguna preocupación sobre la salud humana y ambiental.

Con respecto a la aplicación de la nHAp en la agricultura Rane *et al.* (2015) documentaron que este tipo de NPs pueden mejorar la vitalidad del *Zea mays* al mejorar el contenido y el rendimiento de la clorofila, incrementar el crecimiento de las plantas y la proliferación de raíces. Montalvo *et al.* (2015) utilizaron las nHAp en plantas de trigo (*Triticum aestivum*), mostrando que éstas pueden actuar

como fertilizante fosfatado, ya que su tamaño permite que se muevan con facilidad en el suelo y alcancen las raíces de las plantas a través del flujo masivo de agua creado por la transpiración.

El reporte de Taşkın *et al.* (2018) señalaron que la biomasa seca de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) cultivadas en suelos calcáreos se incrementaron significativamente por el P contenido en las nHAp, siendo este tratamiento más efectivo que la fuente ordinaria de fertilizante usada (H_3PO_4 -P). En plantas de *Solanum lycopersicum*, Marchiol *et al.* (2019) encontraron que el alargamiento de la raíz debido a la aplicación de nHAp fue vigorosamente estimulado, además las plantas de tomate cultivadas en hidroponía no sufrieron efectos fitotóxicos. Con base en esos resultados los autores concluyeron que las nHAp tuvieron efectos promotores no tóxicos y, por lo tanto, podrían usarse como aportadores de P, así como de otros elementos y moléculas.

3. Fitotoxicidad generada por nanopartículas

A pesar de que hay mucha información disponible sobre NM individuales, el nivel de toxicidad de muchas nanopartículas es todavía imperceptible. Ya que existen pocos estudios al respecto, investigación en evaluaciones de riesgo y efectos en la salud humana por la aplicación de estos NM tienen una gran área de oportunidad. Actualmente se tiene una apreciación básica de cómo los NM, interactúan con las células y sus consecuencias biológicas están comenzando a evolucionar con muchos alcances y esperanzas en la agricultura (He *et al.*, 2019). Se considera que muchas propiedades de las nanopartículas tienen un riesgo potencial para la salud humana y las plantas, en las cuales se han observado efectos en la germinación, crecimiento de plántula, citotoxicidad y genotoxicidad (Antisari *et al.*, 2018), por lo que se recomienda desarrollar estrategias para evaluar y gestionar los riesgos que conlleva el uso de esta tecnología, así como también encontrar formas sostenibles de fabricar NM para su uso en la agricultura (Raliya *et al.*, 2017) así como también investigar más a fondo el mecanismo de interacción entre las nanopartículas con las plantas (Shojaei *et al.*, 2019).

La toxicidad de las nanopartículas puede explicarse de dos maneras: (a) toxicidad por la composición química, por ejemplo, liberación de iones metálicos tóxicos, e (b) inhibición o estimulación causada por la morfología, estructura, y/o tamaño de las nanopartículas. (Lee *et al.*, 2010; Manke *et al.*, 2013).

Relacionado con lo anterior, Rui *et al.* (2017), realizaron un trabajo donde evaluaron NPs Ag en maní (*Arachis hypogaea* L.), observándose que estas NPs inhibieron notablemente el crecimiento de las plantas y la formación de vainas. Los tratamientos de 500 y 2000 mg kg⁻¹ disminuyeron en un 21.92 y 29.66% respectivamente la altura de planta en comparación con el control mientras que para la biomasa fresca y seca se mostró una respuesta de acuerdo con la dosis, reduciéndose el rendimiento por planta en 86.62 y 90.63% respectivamente, lo que puede estar relacionado con la inhibición por el tamaño de la partícula.

Otros estudios con NPs de óxidos metálicos [CuO, NiO, TiO₂, óxido de hierro (Fe₂O₃) y Co₃O₄] redujeron la germinación de semillas de lechuga, rábano y pepino mediante la adsorción de éstas sobre las superficies de las semillas y la liberación de iones metálicos, señalando que los efectos tóxicos de las NPs sobre la germinación de semillas varían con los cultivos y el tamaño de la semilla (Rizwan *et al.*, 2017).

Otros estudios muestran los efectos adversos de las nanopartículas metálicas en diversos cultivos, por ejemplo, Landa *et al.* (2016) en su trabajo evaluaron el efecto de NPs ZnO en semillas de *Sinapis alba*, encontraron un efecto tóxico debido al Zn iónico (Zn²⁺) liberado por las NPs en el medio de cultivo, sus resultados mostraron que 1000 mg L⁻¹ de ZnO libera 7.90–11.42 mg L⁻¹ Zn²⁺ y reduce el crecimiento de raíz en 35.5–41.8%, lo que indica en este caso, que el efecto inhibitor depende de la dosis aplicada.

Jain *et al.* (2017), evaluaron la fitotoxicidad de NPs ZnO en mijo perla (*Pennisetum glaucum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y trigo (*Triticum aestivum* L.) seleccionando estos cultivos por ser representativos de zonas áridas, vegetales y cereales respectivamente, además de analizar el efecto de las NPs sobre las características de las semillas como su tamaño y anatomía superficial. Sus resultados mostraron que una concentración de 1,000 mg L⁻¹ redujo la

germinación en 18, 30 and 60% para el mijo perla, tomate y trigo respectivamente. Se descubrió que el mijo perla, debido a la presencia de una cutícula gruesa y lisa en la testa, era relativamente menos sensible a las nanopartículas de ZnO en comparación con el trigo y el tomate, que tienen una capa de semilla relativamente delgada y arrugada.

En las semillas con pliegues es más probable que las NPs se fijen y se mejore la posibilidad de interacción con las NPs, al aumentar la atracción electrostática y las interacciones hidrofóbicas en la superficie de la semilla afectando la fitotoxicidad (Wu *et al.*, 2012).

La cubierta de una semilla se desarrolla principalmente a partir de los tegumentos interno y externo del rudimento seminal, los cuales se convertirán en el tegmen y la testa de la semilla, respectivamente. El tegmen por lo general es delgado y flexible, mientras que la testa es dura (Megias *et al.*, 2015). En la superficie de la testa existe una capa de células a modo de epidermis que desarrollan una cutícula que supone una barrera física para el agua y agentes externos como las nanopartículas, pero es semipermeable a los gases. Histológicamente hay una gran variedad en la organización de la cubierta de las semillas según las diferentes especies de plantas (Bewley *et al.*, 2013).

Por otro lado, como alternativa para disminuir los posibles efectos fitotóxicos de las NPs, se ha propuesto la biosíntesis de éstas, su aplicación es más eficiente y ambientalmente amigable. Estas nanopartículas biosintetizadas presentan una toxicidad relativamente menor en comparación con las nanopartículas producidas químicamente. En consecuencia, debido a la creciente preocupación pública por la nanotoxicidad y su impacto ambiental directo o indirecto, se requiere una atención considerable para el empleo de nanopartículas biosintetizadas con fines agrícolas. Sin embargo, hay una falta completa de estudios dirigidos a la toxicidad, los factores de riesgo asociados y el impacto ambiental de las nanopartículas biosintetizadas. Se considera que la aplicación meticulosa de las nanoformulaciones biosintetizadas en el sistema agrícola eventualmente eliminará su percepción negativa (Mishra *et al.*, 2017).

3.1 Fitotoxicidad generada por nano hidroxapatita

Para el caso de las NPs de hidroxapatita, existen a la fecha tres trabajos que trataron de evidenciar el posible efecto fitotóxico de dichas NPs, sin embargo, sus resultados indican que este efecto es nulo para diferentes cultivos. De acuerdo con Bala *et al.* (2014), es poco probable que la nHAp genere fitotoxicidad, pues en su trabajo con *Cicer arietinum* (garbanzo), se observó un aumento en la tasa de crecimiento de la planta con respecto al control y solo se detectaron trazas del material en los tejidos de las plantas tratadas con 1 mg mL^{-1} a través de micrografías High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM, por sus siglas en inglés), por lo que se cree que la mayor parte de las NPs aplicadas fueron utilizadas por la planta para sus procesos metabólicos. Por otro lado, Marchiol *et al.* (2019), reporta que las nHAp no tuvieron efectos fitotóxicos en plantas de *S. lycopersicum* cultivadas en hidroponía. Sus resultados muestran que el porcentaje de germinación no se vio afectado por ninguna concentración aplicada, mientras que la elongación de raíz si se vio claramente afectada, siendo el mejor tratamiento a 500 mg L^{-1} con un aumento del 97% con respecto al control. Por su parte, Ortiz *et al.* (2017) indica que la nHAp en solución no tiene efectos tóxicos en la germinación de semillas de *L. sativa*.

Sin embargo, contrario a los resultados anteriormente descritos, en el presente estudio se observó que los tratamientos con nHAp afectaron significativamente ($p \leq 0.01$) la germinación y vigor de las semillas, ya que se observó un efecto inhibitorio en el vigor de la germinación a 500 mg L^{-1} ya que esta variable se redujo en 11.83% comparado con el tratamiento control. Para la variable germinación (%) el tratamiento con 1000 mg L^{-1} mostró una reducción de 14.44% contra el control. En cambio, con 200 mg L^{-1} la longitud de plúmula y radícula revelaron un efecto promotor de crecimiento, con una diferencia positiva de 9.52 y 7.59% respectivamente, comparados con el tratamiento control.

Las diferencias antes señaladas pueden estar relacionadas con el tamaño y la morfología de las NPs utilizadas, Bala *et al.* (2014) utilizó nHAp en forma de varilla

con una longitud entre 40 y 80 nm y un diámetro entre 15 a 30 nm, mientras que Marchiol *et al.* (2019) utilizó nHAp con forma de platos irregulares con tamaños entre 94 a 163 nm. Para este trabajo de tesis, las nHAp utilizadas tenían forma de varilla con una longitud entre 10 a 25 nm y un diámetro promedio de 19.13 nm.

Referencias

- ALSTON, A.M. and CHIN, K.W. (1974). Response of subterranean clover to rock phosphates as affected by particle size and depth of mixing in the soil. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 14(70): 649.
- ANTISARI, L.V., CARBONE, S., BOSI, S., GATTI, A. and DINELLI, G. (2018). Engineered nanoparticles effects in soil-plant system: Basil (*Ocimum basilicum* L.) study case. *Applied soil ecology* 123, 551-560.
- ASHBY M.F., FERREIRA P.J. and SCHODEK D.L. (2009). Nanomaterials, nanotechnologies and design. *An introduction for engineers and architects*. Oxford, UK. Butterworth-Heinemann.
- BAJPAI, V.K., KAMLE, M., SHUKLA, S., MAHATO, D.K., CHANDRA, P., HWANG, S.K., KUMAR, P., HUH, Y.S. and HAN, Y.K. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *J Food Drug Anal* 26, 1201.
- BALA, N., DEY, A., DAS, S., BASU, R. and NANDY, P. (2014). Effect of hydroxyapatite nanorod on chickpea (*Cicer arietinum*) plant growth and its possible use as nano-fertilizer. *Iranian Journal of Plant Physiology* 4(3), 1061-1069.
- BANERJEE, S., BAGCHI, B., BHANDARY, S., KOOL, A., HOQUE, N.A., BISWAS, P. and DAS, S. (2018). Antimicrobial and biocompatible fluorescent hydroxyapatite-chitosan nanocomposite films for biomedical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 171, 300-307. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.07.028
- BANOTRA, M., KUMAR, A., SHARMA, B.C., NANDAN, B., VERMA, A., KUMAR, R., GUPTA, V. and BHAGAT, S. (2017). Prospectus of use of nanotechnology in agriculture—a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6, 1541.
- BEWLEY, J.D., BRADFORD, K., HILHORST, H. and NONOGAKI, H. (2013). Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. *New York: Springer*. Doi: 10.1007/978-1-4614-4693-4
- CABRIALES, J.P., CABRERA, O.G. and NÚÑEZ, J.V. (2002). Manejo de los fertilizantes nitrogenados en México: Uso de las técnicas isotópicas (15N). *Terra Latinoamericana*, 20(1), 51-56
- CONTI, M.E. (2000). Dinámica de la liberación y fijación de potasio en el suelo. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*. INPOFOS (8), 25-37.
- CORDELL, D. and WHITE, S. (2015). Tracking phosphorus security: indicators of phosphorus vulnerability in the global food system. *Food Security*, 7(2), 337-350.
- CORDELL, D., DRANGERT, J.O. and WHITE, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2): 292–305.
- COVACEVICH, F., ECHEVERRIA, H.E. and AGUIRREZABAL, L.A. (1998). Influencia del fósforo sobre el crecimiento aéreo y radical de plantas de trigo. *Ciencia del suelo*, 16, 94-98.
- DESHMUKH, K. (2019) Nanotechnology in ancient era. En: *Biotechnology products in everyday life*, (M. Khoobchandani y A. Saxena eds.), Pp. 3.

- Springer International Publishing, Cham.*
- ELFEKY, S.A., MOHAMMED, M.A., KHATER, M.S., OSMAN, Y.A. and ELSHERBINI, E. (2013). Effect of magnetite nano-fertilizer on growth and yield of *Ocimum basilicum* L. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants* 46(3), 1286-1293.
- FAGERIA, N. K. (2016). The use of nutrients in crop plants. *CRC press*.
- FAROKHI, M., MOTTAGHITALAB, F., SAMANI, S., SHOKRGOZAR, M.A., KUNDU, S.C., REIS, R.L. and KAPLAN, D.L. (2018). Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Biotechnology advances* 36(1): 68-91.
- FAROKHZAD, O.C. and LANGER, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano* 3 1, 16-20.
- FRACETO, L.F., GRILLO, R., DE MEDEIROS, G.A., SCOGNAMIGLIO, V., REA, G. and BARTOLUCCI, C. (2016). Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? *Frontiers in Environmental Science* 4.
- GARCÍA-GUERRERO, M. The fever of nanotechnologies: promises, investment and short results in the era of technoscience. En: Navas-Sierra, J. A. *Tecnologías disruptivas del proceso de globalización*. Ed. 86. Bogotá: Ediciones Universidad Cooperativa de Colombia. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.16925/9789587601268>
- GIROTO, A.S., FIDÉLIS, S.C and RIBEIRO, C. (2015). Controlled release from hydroxyapatite nanoparticles incorporated into biodegradable, soluble host matrixes. *Royal Society of Chemistry Advances*. 5(126): 104179-104186.
- GIROTO, A.S., GUIMARÃES, G.G., FOSCHINI, M. and RIBEIRO, C. (2017). Role of slow-release nanocomposite fertilizers on nitrogen and phosphate availability in soil. *Scientific reports*, 7, 46032.
- GOUDA, S., GEORGE KERRY, R., DAS, G. and KUMAR PATRA, J. (2019). Synthesis of Nanoparticles Utilizing Sources from the Mangrove Environment and Their Potential Applications. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms* 219–235. doi:10.1016/b978-0-12-811488-9.00011-1
- HABIBOVIC, P., BARRÈRE, F., BLITTERSWIJK, C.A., GROOT, K. and LAYROLLE, P. (2004). Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. *Journal of the American Ceramic Society* 85, 517.
- HE, X., DENG, H. and HWANG, H.M. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of food and drug analysis*, 27(1), 1-21.
- HEILIGTAG, F.J. and NIEDERBERGER, M. (2013). The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today*, 16(7-8), 262-271.
- HOLFORD, I.C.R. (1997). Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. *Soil research* 35, 227.
- HULLMANN, A. (2007). Measuring and assessing the development of nanotechnology. *Scientometrics* 70(3), 739-758.
- JAIN, N., BHARGAVA, A., PAREEK, V., AKHTAR, M.S. and PANWAR, J. (2017). Does seed size and surface anatomy play role in combating phytotoxicity of nanoparticles? *Ecotoxicology* 26(2): 238-249.
- KAH, M., KOOKANA, R.S., GOGOS, A. and BUCHELI, T.D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional

- analogues. *Nature nanotechnology* 13(8), 677.
- KIM, D.Y., KADAM, A., SHINDE, S., SARATALE, R.G., PATRA, J. and GHODAKE, G. (2018). Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: A transition replete with opportunities. *J Sci Food Agric* 98, 849.
- KJELD S. (1993) Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation, *Acta Orthopaedica Scandinavica* 64:255, 1-58. Doi: 10.3109/17453679309155636
- KUMAR, A., GUPTA, K., DIXIT, S., MISHRA, K. and SRIVASTAVA, S. (2018). A review on positive and negative impacts of nanotechnology in agriculture. *International Journal of Environmental Science and Technology* 1-10.
- LANDA, P., CYRUSOVA, T., JERABKOVA, J., DRABEK, O., VANEK, T. and PODLIPNA, R. (2016). Effect of metal oxides on plant germination: phytotoxicity of nanoparticles, bulk materials, and metal ions. *Water, Air, & Soil Pollution* 227(12), 448.
- LEE, C.W., MAHENDRA, S., ZODROW, K., LI, D., TSAI, Y.C., BRAAM, J. and ALVAREZ, P.J. (2010). Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 29(3), 669-675.
- LEGEROS, R.Z. and LEGEROS, J.P. (2003). Calcium phosphate bioceramics: past, present and future. In *Key Engineering Materials* (Vol. 240, pp. 3-10). Trans Tech Publications.
- LI, W.M., CHEN, S.Y. and LIU, D.M. (2013). In situ doxorubicin–CaP shell formation on amphiphilic gelatin–iron oxide core as a multifunctional drug delivery system with improved cytocompatibility, pH-responsive drug release and MR imaging. *Acta biomaterialia* 9(2): 5360-5368.
- LI, Z. and HUANG, J. (2014). Effects of nanoparticle hydroxyapatite on growth and antioxidant system in pakchoi (*Brassica chinensis* L.) from cadmium-contaminated soil. *Journal of Nanomaterials*.
- LIU, R. and LAL, R. (2014). Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Scientific Reports* 4, 5686. Doi:10.1038/srep05686
- MANKE, A., WANG, L. and ROJANASAKUL, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international* 2013.
- MARCHIOL, L., FILIPPI, A., ADAMIANO, A., DEGLI ESPOSTI, L., IAFISCO, M., MATTIELLO, A. and BRAIDOT, E. (2019). Influence of Hydroxyapatite Nanoparticles on Germination and Plant Metabolism of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Preliminary Evidence. *Agronomy* 9(4): 161. Doi: 10.3390/agronomy9040161.
- MATINFAR, M., MESGAR, A.S. and MOHAMMADI, Z. (2019). Evaluation of physicochemical, mechanical and biological properties of chitosan/carboxymethyl cellulose reinforced with multiphasic calcium phosphate whisker-like fibers for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*.
- MEGIAS, M., MOLIST, P. and POMBAL, M.A. (2015). Atlas de Histología Vegetal y Animal: Órganos vegetales. Semilla. Recuperado de:

- <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/o-v-semilla.pdf>
- MIROIU, F.M., SOCOL, G., VISAN, A., STEFAN, N., CRACIUN, D., CRACIUN, V. and DUCU, C. (2010). Composite biocompatible hydroxyapatite–silk fibroin coatings for medical implants obtained by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation. *Materials Science and Engineering: B* 169(1-3): 151-158. Doi: 10.1016/j.mseb.2009.10.004
- MISHRA, S., KESWANI, C., ABHILASH, P.C., FRACETO, L.F. and SINGH, H.B. (2017). Integrated approach of agri-nanotechnology: Challenges and future trends. *Front Plant Sci* 8, 471.
- MOHAMMADI, M.R., NOJOOI, A., MOZAFARI, M., DUBNIKA, A., INAYATHULLAH, M. and RAJADAS, J. (2017). Nanomaterials engineering for drug delivery: a hybridization approach. *Journal of Materials Chemistry B* 5(22): 3995-4018. Doi: 10.1039/c6tb03247h-
- MONTALVO, D., MCLAUGHLIN, M. J. and DEGRYSE, F. (2015). Efficacy of hydroxyapatite nanoparticles as phosphorus fertilizer in andisols and oxisols. *Soil Science Society of America Journal* 79(2). Doi: 10.2136/sssaj2014.09.0373.
- MOZAFARI, M. (2014). Bioceramics in the Realm of History. *Bioceramics Dev. Appl* 4: e106.
- NOPPAKUNDILOGRAT, S., PHEATCHARAT, N., KIATKAMJORNWONG, S. (2015). Multilayer-coated NPK compound fertilizer hydrogel with controlled nutrient release and water absorbency. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(2).
- ONASANYA, R.O., AIYELARI, O.P., ONASANYA, A., OIKEH, S., NWILENE, F.E. and OYELAKIN, O.O. (2009). Growth and yield response of maize (*Zea mays* L.) to different rates of nitrogen and phosphorus fertilizers in southern Nigeria. *World Journal of Agricultural Sciences* 5(4), 400-407.
- ONU (2019) La agricultura en el siglo XXI: un nuevo paisaje para la gente, la alimentación y la naturaleza. Consulta: 08 enero 2020. Disponible en: <http://www.onu.org.mx/la-agricultura-en-el-siglo-xxi-un-nuevo-paisaje-para-la-gente-la-alimentacion-y-la-naturaleza/>
- ORTIZ, C.G., CARRILLO-GONZÁLEZ, R., GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.C.A. and LÓPEZ, L.J. (2017). Síntesis de nanopartículas de hidroxapatita y su toxicidad en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *AGROProductividad*, 10(12), 98-106.
- PAWŁOWSKI, L. (2018). Synthesis, Properties and Applications of Hydroxyapatite. *Industrial Chemistry of Oxides for Emerging Applications*, 311-352.
- PÉREZ-DE-LUQUE, A. (2017). Interaction of nanomaterials with plants: What do we need for real applications in agriculture? *Frontiers in Environmental Science* 5.
- PRASAD, R., BHATTACHARYYA, A. and NGUYEN, Q.D. (2017). Nanotechnology in sustainable agriculture: Recent developments, challenges, and perspectives. *Front Microbiol* 8, 1014.
- QI, C., MUNETTI, S., FU, L.H., ZHU, Y.J., and HUANG, L. (2019). Biomolecule-assisted green synthesis of nanostructured calcium phosphates and their biomedical applications. *Chem Soc Rev* Doi: 10.1039/c8cs00489g.

- RALIYA, R., SAHARAN, V., DIMKPA, C. Y BISWAS, P. (2017). Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- RANE, M., BAWSKAR, M., RATHOD, D., NAGAONKAR, D. and RAI, M. (2015). Influence of calcium phos-phate nanoparticles, *Piriformospora indica* and *Glomus mosseae* on growth of *Zea mays*. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 6(4): 1- 8.
- RINCÓN, L.E.C. and GUTIÉRREZ, F.A.A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295.
- RIZWAN, M., ALI, S., QAYYUM, M.F., OK, Y.S., ADREES, M., IBRAHIM, M., ABBAS, F. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *J Hazard Mater* 322(Pt A), 2-16. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.061
- ROCO, M.C. (2005). Environmentally responsible development of nanotechnology.
- ROP, K., KARUKU, G.N., MBUI, D., MICHIRA, I. and NJOMO, N. (2018). Formulation of slow release NPK fertilizer (cellulose-graft-poly(acrylamide)/nano-hydroxyapatite/soluble fertilizer) composite and evaluating its n mineralization potential. *Annals of Agricultural Sciences* 63, 163.
- RUI, M., MA, C., TANG, X., YANG, J., JIANG, F., PAN, Y. and XING, B. (2017). Phytotoxicity of silver nanoparticles to peanut (*Arachis hypogaea* L.): physiological responses and food safety. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 5(8): 6557-6567. Doi: 10.1021/acssuschemeng.7b00736
- SALACHNA, P., BYCZYŃSKA, A., ZAWADZIŃSKA, A., PIECHOCKI, R. and MIZIELIŃSKA, M. (2019). Stimulatory Effect of Silver Nanoparticles on the Growth and Flowering of Potted Oriental Lilies. *Agronomy* 9(10), 610.
- SALDIVAR, R.H.L., ARGÜELLO, B.M., DE LOS SANTOS VILLARREAL, G. and REYES, I.V. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria* 28(2): 9-24. Doi: 10.15174/au.2017.1575.
- SCOTT, N.R., CHEN, H. and CUI, H. (2018). Nanotechnology applications and implications of agrochemicals toward sustainable agriculture and food systems. *J Agric Food Chem* 66, 6451.
- SHEPHERD, J.H., SHEPHERD, D.V. and BEST, S.M. (2012). Substituted hydroxyapatites for bone repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23(10), 2335–2347. Doi: 10.1007/s10856-012-4598-2
- SHOJAEI, T.R., SALLEH, M.A.M., TABATABAEI, M., MOBILI, H., AGHBASHLO, M., RASHID, S.A., TAN, T. (2019). Chapter 11 Applications of Nanotechnology and Carbon Nanoparticles in Agriculture. Editor(s): Rashid, S.A., Othman, R.N.I.R., Hussein, M.Z. In *Micro and Nano Technologies, Synthesis, Technology and Applications of Carbon Nanomaterials*, Elsevier 247-277, ISBN 9780128157572, Doi: 10.1016/B978-0-12-815757-2.00011-5.
- SORIANO, M.L., ZOUGAGH, M., VALCARCEL, M. and RIOS, A. (2018). Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we

- are heading. *Talanta* 177, 104-121. Doi: 10.1016/j.talanta.2017.09.012
- SUBRAMANIAN, K.S., MANIKANDAN, A., THIRUNAVUKKARASU, M., and RAHALE, C.S. (2015). Nano-fertilizers for Balanced Crop Nutrition. In M. Rai, C. Ribeiro, L. Mattoso, & N. Duran (Eds.), *Nanotechnologies in Food and Agriculture* (pp. 69-80). Cham: Springer International Publishing.
- SUN, W., FAN, J., WANG, S., KANG, Y., DU, J. and PENG, X. (2018). Biodegradable Drug-Loaded Hydroxyapatite Nanotherapeutic Agent for Targeted Drug Release in Tumors. *ACS Appl Mater Interfaces* 10(9): 7832-7840. Doi: 10.1021/acsami.7b19281
- ŠUPOVÁ, M. (2015). Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics International* 41(8): 9203-9231. Doi: 10.1016/j.ceramint.2015.03.316
- SZCZEŚ, A., HOŁYSZ, L. and CHIBOWSKI, E. (2017). Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science* 249, 321.
- TAŞKIN, M.B., ŞAHİN, Ö., TASKIN, H., ATAKOL, O., INAL, A. and GUNES, A. (2018). Effect of synthetic nano-hydroxyapatite as an alternative phosphorus source on growth and phosphorus nutrition of lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Journal of Plant Nutrition* 41(9): 1148-1154.
- TENG, Q., ZHANG, D., NIU, X. and JIANG, C. (2018). Influences of application of slow-release Nano-fertilizer on green pepper growth, soil nutrients and enzyme activity. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 208:1, 012014. IOP Publishing.
- THOMSON, R.C., YASZEMSKI, M.J., POWERS, J.M. and MIKOS, A.G. (1998). Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration. *Biomaterials* 19, 1935.
- VISHWAKARMA, K., UPADHYAY, N., KUMAR, N., TRIPATHI, D.K., CHAUHAN, D.K., SHARMA, S. and SAHI, S. (2018). Potential Applications and Avenues of Nanotechnology in Sustainable Agriculture. In *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms* (pp. 473-500). Academic Press.
- WU, S.G., HUANG, L., HEAD, J., CHEN, D.R., KONG, I.C. and TANG, Y.J. (2012). Phytotoxicity of metal oxide nanoparticles is related to both dissolved metals ions and adsorption of particles on seed surfaces. *J Pet Environ Biotechnol* 3(4), 126.
- ZAPATA, F. and ROY, R.N. (Eds.). (2007). Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Roma, Italia: FAO.
- ZHOU, H. and LEE, J. (2011). Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 7, 2769.

Artículos

Artículo 1. (Aceptado)

Vol. 19, No. 1 (2020) 285-298



Revista Mexicana de Ingeniería Química

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CALCIUM PHOSPHATE NANOPARTICLES AND EFFECT OF THE AGITATION TYPE ON PARTICLES MORPHOLOGY

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO CALCÍCO Y EFECTO DEL TIPO DE AGITACIÓN EN LA MORFOLOGÍA DE LAS PARTÍCULAS

E.Á. Flores-Hernández¹, R.H. Lira-Saldívar^{2,4}, R. Acosta-Ortiz², B. Méndez-Arguello³, J.J. García-López⁴, E. Díaz-Barriga-Castro², A. González-Torres¹, M. García-Carrillo¹

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna (UAAN-UL), Per. Jérico Raúl López Sánchez S/N, Col. Valle Verde, C.P. 27054, Torréón, Coahuila, México.

² Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Blvd. Enrique Reyna Hermosillo No. 140 C.P. 25294, Saltillo, Coahuila, México.

³ Universidad Intercultural del Estado de Puebla, Calle Principal a Lipunihahuaca S/N, Lipunihahuaca, Huehuetla, Puebla, México.

⁴ Laboratorio de Química y Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Nuevo León C.P. 66050, México.

Received: February 21, 2019; Accepted: May 7, 2019

Abstract

This paper reports a rapid, economic and efficient process to prepare calcium phosphate nanoparticles (nCP), also known as hydroxyapatite. The objective of this study was to synthesize, characterize and determine the effect of agitation type on production and morphology of nCP. Synthesis was carried out by wet chemical precipitation, with mechanical and magnetic agitation. TEM microscopy indicates that mechanical agitation produced ~ 27% particles with diameter between 15-20 nm, while magnetic stirring formed 31.1%. The sizes range obtained for both agitations types was 10 to 45 nm, with the predominant size being 15 to 20 nm. The FTIR spectrometry analysis revealed that the nCP obtained are analogous to those reported in the literature. Zeta potential values of -20 mV to -14 mV were obtained for mechanical and magnetic agitation respectively, suggesting that nCP synthesized by mechanical agitation has greater electrostatic repulsion in aqueous suspension. The results obtained reveal that mechanical stirring improves the nanocomposite characteristics and produce colloidal particles more stable in aqueous suspension. We consider that the process reported here could be scalable to produce nCP, which has commercial potential as a nanofertilizer for agricultural use.

Keywords: characterization, morphology, nanoparticles, hydroxyapatite.

Resumen

Este artículo reporta un proceso rápido, económico y eficiente para preparar nanopartículas de fosfato de calcio (nPC), también conocida como hidroxiapatita. El objetivo de este estudio fue sintetizar, caracterizar y determinar el efecto del tipo de agitación en la producción y morfología de las nPC. La síntesis se realizó mediante precipitación química húmeda, con agitación mecánica y magnética. La microscopía TEM indica que la agitación mecánica produjo ~ 27% de partículas con un diámetro entre 15-20 nm, mientras que la agitación magnética produjo 31.1%. El rango de tamaños obtenidos para ambos tipos de agitación fue de 10 a 45 nm, con un tamaño predominante de 15 a 20 nm. El análisis de espectrometría FTIR reveló que las nPC obtenidas son análogas a las reportadas en la literatura. Se obtuvieron valores de potencial Zeta de -20 mV a -14 mV para la agitación mecánica y magnética respectivamente, esto sugiere que las nPC sintetizadas por agitación mecánica son más estables en suspensión. Los resultados revelan que la agitación mecánica mejora las características del nanocompuesto y produce partículas coloidales más estables en suspensión acuosa. Consideramos que el proceso aquí descrito podría ser escalable para producir nPC, que pudiese tener potencial comercial como nanofertilizante para uso agrícola.

Palabras clave: caracterización, morfología, nanopartículas, hidroxiapatita.

* Corresponding author. E-mail: ljnp@ciqa.edu.mx

ISSN 2395-8472
DOI: 10.14727/RIQ.19.1.285-298
ISSN-e: 2395-8472

Introduction

The interdisciplinary research on biosystems at nanoscale involves physical sciences, chemical and molecular engineering, biology, biotechnology, medicine and agronomy (Ferreira and Filipe, 2018), complementing in this way the knowledge required for the synthesis of new products and agro-inputs, which are used in food systems (Prakash *et al.*, 2018), regenerative medicine (Yang *et al.*, 2019) and in the development of new intelligent textiles (Asif and Hasan, 2018), among many other applications. The synthesis and use of metallic, mineral and carbon-derived nanoparticles (NPs) represent a very attractive and promising area, because of the potential impact on current and future society.

It has been pointed out that hydroxyapatite NPs (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Figure 1) also known as calcium nanophosphate (nCF), it is considered as one of the most prominent materials for therapeutic applications, and owing to its phosphorus (P) and calcium (Ca) content, it has a promissory potential as fertilizer in agriculture, although the latter possibility still needs many studies and validation in the field (Kottegoda *et al.*, 2017). One of the main applications of HA NPs is in the biomedical area, since they can be used in therapy and transport of genes, for bone repair treatment, as well as in acquired and inherited diseases

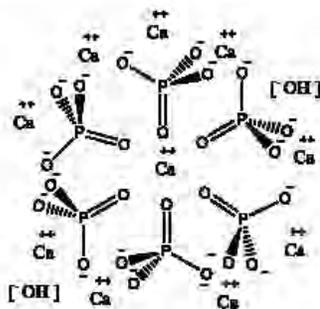


Fig. 1 Chemical structure of a molecule of hydroxyapatite also known as calcium phosphate, mainly formed by crystalline calcium phosphate, being the main inorganic component of bones in vertebrates.

(Bakan, 2018). Salgado-Delgado *et al.* (2016) reported that poly (2-hydroxyethyl methacrylate) and chitosan were combined to obtain a biocomposite material with fillers of hydroxyapatite through foaming gas effect. Their results obtained by SEM indicate a biocomposite formation having high porosity, with an interpenetrated network in the porous material, which could be used for medical applications.

Other important uses of nCF are in water treatment and remediation of soils polluted with heavy metals (Sadat *et al.*, 2013). Mendoza-Casillo *et al.* (2016), stated that the use of bone char which contains hydroxyapatite, could be considered as alternative sorbent for treatments of aqueous solutions polluted by Cd^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} . It has also been documented that this type of NPs can increase the vitality of *Zea mays* plants by improving the content and production of chlorophyll, increasing the growth of plants and the proliferation of roots, so that this type of NPs could be used as high efficiency nanofertilizers (Rane *et al.*, 2015).

In many regions of Mexico as in other countries with agricultural vocation, the efficient use of fertilizers is highly demanded to optimize the cost of crops production, to make a sustainable use of inputs and to reduce contamination of agroecosystems (Bationo *et al.*, 2018). Between 50-70% of nitrogen (N) applied to the soil as conventional fertilizer is lost due to leaching and volatilization such as ammonia and N oxides (Kottegoda *et al.*, 2011). In acidic and alkaline soils that make up more than 70% of the world's arable land, P forms insoluble compounds; in acidic soils it forms phosphates of Al and Fe, while in alkaline soils it forms phosphates of Ca and Mg, all of them with low solubility (Holford, 1997), that are not available to plants, therefore, up to 80% of the applied P is lost because it becomes immobile and unusable for crops (Lopez-Bucio *et al.*, 2000).

Therefore, nanotechnology (NT) as a tool to formulate nanopesticides and nanofertilizers offers a significant improvement for the efficient use of this costly and important agro-input. Montalvo *et al.* (2015) carried out a work where nCF was used as phosphorous fertilizer; they performed an assay using the technique of P isotope dilution, to quantify the absorption of P by plants of *Triticum aestivum* from nCF, calcium phosphate (CF) and triple superphosphate, applied to different types of soils. The results showed that P release and solubility was higher with nCF.

Scientific literature accounts with numerous publications referring to the most common procedures

to obtain nCF. Sadai *et al.* (2013) made a classification of five main methods: 1) dry processes, 2) wet processes, 3) high temperature processes, 4) synthesis from biological sources and 5) a combination of these procedures. It is considered that the conventional wet precipitation process is the simplest, easier and most popular to use (Kollegoda *et al.*, 2011), due to insolubility of nCF in water (Guzmán *et al.*, 2005). The conditions for these reactions are easily controllable and versatile with economic advantages like cost-effective on industrial scale, reproducibility and the fact that not require expensive equipment, because by mixing two aqueous solutions results in the formation of highly supersaturated solutions of nCF, which induces rapid precipitation of nanoparticles (Angelescu *et al.*, 2011; Okada and Maizumi, 2015).

Thus, the objective of this work was to evaluate a simple and economic chemical process that produce the highest amount of nCF powders, considering that in the medium term this technique could be used for the commercial production of nanofertilizers.

2 Materials and methods

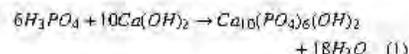
2.1 Materials and equipment

The following reagents were used: phosphoric acid (H_3PO_4 , 85%), calcium hydroxide [$Ca(OH)_2 \geq 95\%$] and ammonium hydroxide ($NH_4OH \geq 85\%$), were of analytical grade (Jalmek brand). The employed laboratory equipment was: JKA brand digital helical agitator model RW 20; a magnetic stirrer with heating, Thermo Scientific brand; an electric heating mantles for ball flask; a condenser with recirculating bath and a potentiometer Thermo Scientific model Orion Star A211.

2.2 Synthesis of calcium phosphate nanoparticles (nCF)

The synthesis of nCF was carried out with a procedure similar to that described by Guzmán *et al.* (2005), which consisted on performing forced mechanical agitation at 1,000 rpm, repeating the procedure and applying magnetic stirring with a speed of 1,200 rpm. An aqueous solution of calcium hydroxide [$Ca(OH)_2$] and orthophosphoric acid (H_3PO_4) was used, with a stoichiometric Ca/P ratio of 1.67 (Yelien and Yilmaz, 2016), adjusting the final pH to 11.74 by means of a ammonium hydroxide solution. Subsequently the

mixture was kept in constant agitation and heated to 95 °C in order to activate the chemical reaction, which was executed according to the following equation:



Once the nCF synthesis reaction was carried out, the resulting solution was allowed to stand for 72 h until the expected product was precipitated, observing the phase separation at the end of the indicated time. This was performed by making a modification to the procedure indicated by Guzmán *et al.* (2005), by eliminating the supernatant by decantation. Subsequently, the precipitate was dried for 72 h at 110 °C.

2.3 Characterization by infrared spectroscopy and Fourier transforms (FTIR)

The nCF samples were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) technique, recorded in a Thermo Scientific infrared spectrometer model Nicolet 6700, and using the KBr disc technique.

2.4 Characterization by X-ray diffraction (XRD)

An XRD Rigaku Ultima IV diffractometer with $K\alpha Cu$ radiation (1.54183 Å) was used to analyze nCF samples. The XRD diffraction patterns were recorded in a 2θ range of 10 to 80 ° with the minimum step size of 0.02 ° and with a sweep of 5 °/min. The calculation to obtain the average size of crystallite particles, was carried out by means of the Halder-Wagner method (Izumi and Takuji, 2015) and the software installed in the diffractometer employed.

2.5 Characterization by transmission electron microscope (TEM)

The samples morphology and microstructure was determined by using a FEI-TITAN 80-300 kV microscope operated at an acceleration voltage of 300 kV. The samples for these analyses were prepared by depositing and evaporating a drop of the colloidal solution on lacey carbon copper grids. The processing of TEM micrographs, were interpreted using the Digital Micrograph 3.7.0 software (Gatan Software, Inc., Pleasanton, CA, USA). nCF description was performed with a transmission electron microscopy images and high resolution (TEM and HRTEM), as well by electron diffraction (SAED).

2.6 Characterization by Zeta potential (ZP)

In the present study ZP was determined using a ZETA-check micro trac equipment from Colloid Metrix Company and a microscope to observe the colloidal particles inside a chamber or electrophoretic cell. ZP determines the surface charge of nanoparticles when measuring their electrical potential, which can be affected by particle composition and the medium in which it is dispersed (Velasco *et al.*, 2012). This variable represents the amount of repulsion or electrostatic attraction (or charge) between nCF particles and other particles. It is one of the important parameters that affect the stability of a suspension (Saxena and Okram, 2018). The measurement of this parameter provides detailed information on the causes for dispersion, aggregation or flocculation, and can be applied to improve the formulation of dispersions, emulsions and suspensions (Mikolajczyk *et al.*, 2015).

3 Results

3.1 Synthesis of calcium phosphate nanoparticles

nCFs were obtained by means of mechanical and magnetic agitation with an average size between 10

to 45 nm (Figure 2). These dimensions are within the desirable range for biomedical applications, mainly for bone tissue applications (Sunandhakumari *et al.*, 2018; Saitary *et al.*, 2019) and for their study and practice in agriculture (Kottegoda *et al.*, 2017).

3.2 Characterization of calcium phosphate nanoparticles

Figure 3 shows the FTIR spectrum obtained from the nCF sample obtained by mechanical agitation. Typical bands were observed for this mineral, identical to those reported in the literature (Ma, 2012; Gheisari *et al.*, 2015). A main band centered at 1060 cm^{-1} is appreciated as well as other bands centered at 964 , 606 and 573 cm^{-1} respectively, which are distinctive of the phosphate groups. The narrow band at 3571 cm^{-1} is attributed to the stretch vibration of the hydroxyl groups. The wide band centered at 3430 cm^{-1} together with the signal at 1639 cm^{-1} , indicate the presence of adsorbed water on the nCF surface, while the signals at 1456 cm^{-1} and 1424 cm^{-1} correspond to carbon dioxide, which is also adsorbed on the NPs surface. The spectrum of the magnetically stirred sample displayed an identical FTIR spectrum to that obtained by mechanical stirring.

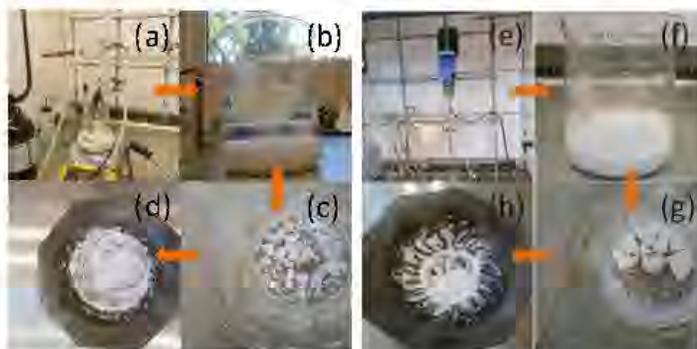


Fig. 2. Process for the synthesis of nCF NPs (a) and (e) arrangement of laboratory instruments for the synthesis reaction by magnetic and mechanical agitation respectively. (b) and (f) solution obtained after the reaction by both types of agitation. (c) and (g) product obtained after drying for magnetic and mechanical stirring respectively. (d) and (h) reduction of particle size.

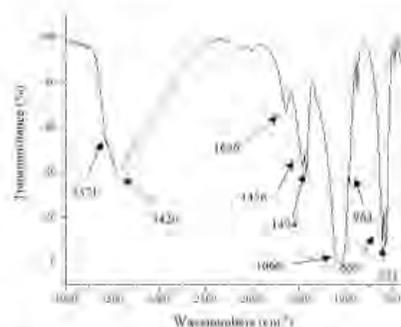


Fig. 3. Fourier transform infrared transmission spectroscopy (FTIR) of the calcium phosphate sample obtained by the mechanical agitation technique.

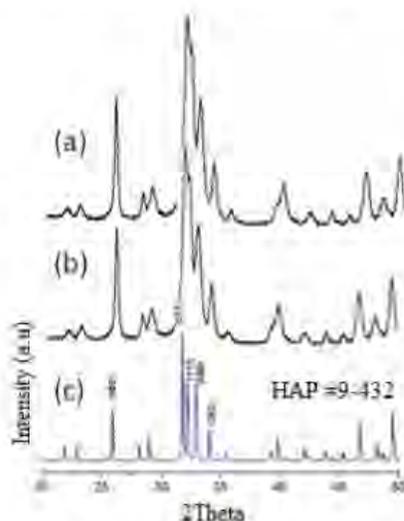


Fig. 4. XRD diffraction patterns of the nCF NPs powder sample obtained by: (a) Magnetic stirring, (b) Mechanical stirring and (c) Standard diffraction pattern for HAP according to JCDPS letter 9-432.

Figures 4 (a) and 4 (b) shows the X-ray diffraction patterns of the precipitate obtained by means of non-calcined wet chemical synthesis and using magnetic and mechanical agitation. The obtained results agree with typical responses with greater intensity in the

peaks (002, 211, 112, 300 and 202), characterizing this powder as a pure calcium phosphate, according to the international data base JCDPS 9-432, as shows in Figure 4 (c), thus confirming the formation of nCF.

Our results show that the agitation type and the speed applied did not cause a significant difference on size of crystallite produced, since the average size for the magnetic stirring was 10.9 ± 1.1 nm, while by means of mechanical agitation the average size was 15.2 ± 1.3 nm, a difference of 6.7 nm (28.28% larger size) was attained by means of mechanical agitation. The NPs size distribution is presented in Figures 5 (a) and 5 (b).

In order to evaluate the previous results, a sample analysis was carried out using the TEM microscope, Figure 6 (a) depicts the TEM image of an nCF synthesized with mechanical agitation. In this micrograph an elongated rod shape of nCF is observed. Figure 6 (b) shows the distribution of nCF sizes after measuring 350 nanoparticles. The majority (~ 65%) of NPs displayed diameters of 10 to 25 nm, but only ~ 4% exhibited sizes greater than 35 nm. Figure 6 (c) shows a representative image of HRTEM, where the molecule diameter with a mean value of 29.26 nm is clearly appreciated. This outcome agrees with the average size frequency observed in the scheme of panel 6 (b). The SAED diffraction pattern obtained from the area observed in panel (a), is shown in Figure 6 (d). This pattern is made up of irregular rings associated with the planes (211, 102, 201 and 200) of the structure of nCF.

Dimension measurements were made by triplicate for each type of agitation employed. The image analysis to determine main diameter of each process was performed using TEM images of the three replicates by measuring at least the 350 nanoparticles each time. For FTIR, XRD and ZP analyzes, there were no differences between analyses, and therefore, only one of the results is reported here. To determine the particle size distribution from the CTEM images, the following procedure was performed: 1) Using the Image Pro 10 software, mean diameter of 350 NPs was measured for each agitation method. 2) From the obtained data, the absolute frequency for typical diameter ranges was determined. 3) With the above data expressed as a percentage the histograms created and are presented on Fig. 6 (b) and Fig. 7 (b).

Figure 7 (a) is a conventional TEM micrograph corresponding to the nCF magnetically stirred sample, in which the quasi-spherical morphology is clearly visible. Figure 7 (b) shows the size distribution that resulted after measuring 350 nanoparticles.

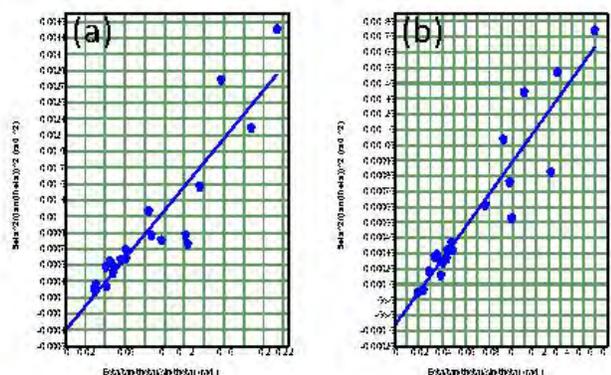


Fig. 5. Graphs of crystalline size distribution achieved by the Halder-Wagner method, and obtained by wet chemical reaction and magnetic (a) and mechanical (b) agitation.

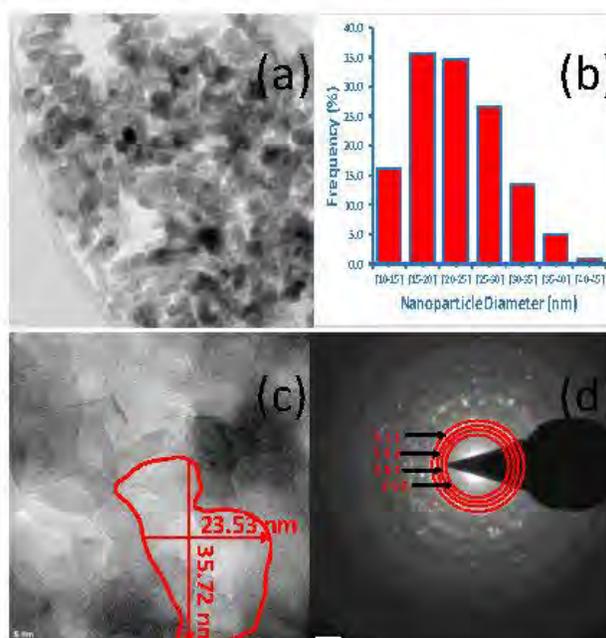


Fig. 6. Micrographs corresponding to the nCF sample obtained by mechanical agitation. Image of TEM (a). Distribution of the size of NPs (b). HRTEM image of a nanoparticle (c). SAED diffraction pattern obtained from the area observed in the panel (d).

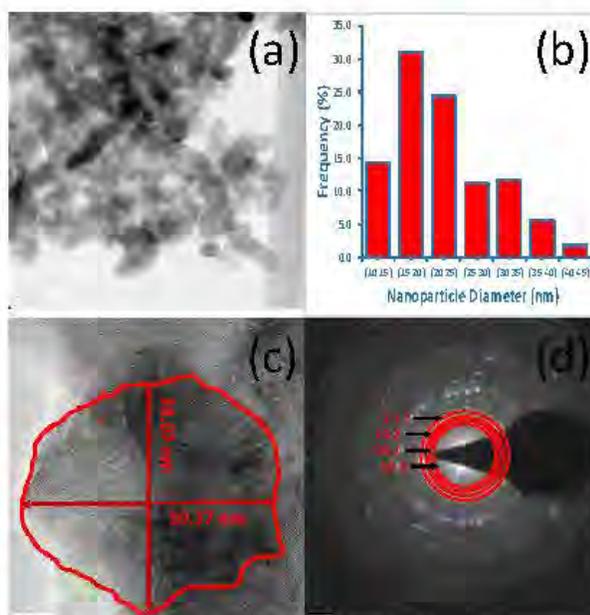
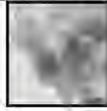


Fig. 7. Micrographs corresponding to the nCF sample obtained by magnetic agitation. (a) TEM image (a). Distribution of the size of NPs (b). HRTEM image of a nanoparticle (c). SAED diffraction pattern obtained from the area observed in panel (b).

Table 1. Effect of mechanical and magnetic stirring on some characteristics related to nanophosphate calcium synthesized, such as diameter range, number of particles per diameter range, average size and statistical parameters.

Mechanical stirring / Magnetic stirring					
Diameter range of NPs (nm)	Number of Particles by diameter	Particles average size	Standard deviation	Standard error	Variability coefficient
10-15	43 / 49	13.26 / 13.23	1.27 / 1.54	0.19 / 0.22	9.57 / 11.66
15-20	95 / 106	17.7 / 17.55	1.41 / 1.36	0.14 / 0.13	7.98 / 7.77
20-25	92 / 83	22.84 / 22.33	1.34 / 1.39	0.14 / 0.15	5.88 / 6.23
25-30	71 / 38	27.44 / 27.36	1.55 / 1.46	0.18 / 0.24	5.66 / 5.34
30-35	36 / 40	32.2 / 32.64	1.32 / 1.48	0.22 / 0.23	4.11 / 4.53
35-40	13 / 19	37.17 / 37.61	1.27 / 1.62	0.35 / 0.37	3.42 / 4.31
40-45	2 / 6	42.32 / 42.05	2.84 / 1.75	2.01 / 0.71	6.71 / 4.15

Table 2. Nanophosphate calcium characteristics related to morphology, yield, and ZP based on the employed agitation type.

Type of agitation and nCF shape	nCF morphology	Yield (g/L)	Z Potential (mV)
Magnetic agitation (quasi spherical shape)		100	-14.5
Mechanical agitation (rod shape)		100	-20.0

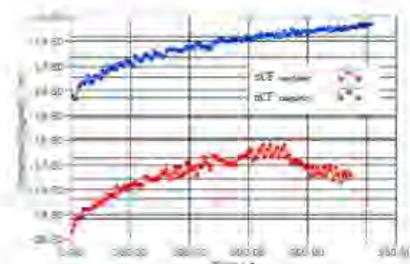


Fig. 8. Zeta potential illustrating the electrical potential related to the dispersion of the aqueous suspension of the calcium phosphate nanoparticles, which were obtained by mechanical agitation and magnetic stirring.

Most NPs (~ 70%) displayed average diameters from 10-25 nm, and only ~ 7% exhibited sizes greater than 35 nm. Figure 7 (c) is a representative image of HRTEM, where an average diameter of 29.22 nm is observed. Figure 7 (d) reveals the SAED diffraction pattern obtained from the area observed in panel (a), revealing that the pattern is made up of irregular rings associated with the planes (211, 102, 002 and 200) of the nCF structure.

Table 1 shows the comparative data resulting from measurements of nCF diameters obtained by two agitation types employed for the production of nCF by wet chemical precipitation method. Table 2 displays some morphological characteristics like average size and estimated yield for each agitation type. The ZP value as a function of time and the two types of

agitation used for the synthesis of the nCF is presented in Figure 8. The results show values of up to -20 mV (millivolts), but with a tendency toward zero with increasing time.

Regarding the morphology of the nanoparticles, there is a noticeable difference between the types of agitation employed, since the quasi spherical and rod shapes obtained depended on the stirring method. In the case of mechanical agitation mostly prevailed a shaped rod nanoparticles, while the magnetic stirring made almost spherical shapes, having a size between 15 and 25 nm; which is in agreement with Alvear *et al.* (2017), since these authors also reported that agitation speed in the case of mechanical agitation induced smaller particle sizes (Fig. 8.)

Table 3 shows the economical features associated to produce 1 kg of nCF by three different methods, taking into account only the expenses for ACS grade reagents, according to local suppliers' quotation, leaving aside other collateral expenses such as laboratory equipment, time of process, as well as electric energy used. The nCF synthesis processes analyzed were wet chemical precipitation, sol-gel and dry method. The specific reactions for each synthesis methods are presented as follows:

Reactions for wet chemical precipitation according to Guzmán *et al.* (2005):

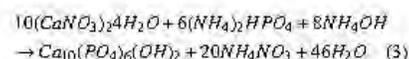
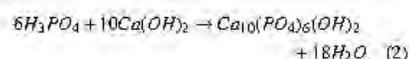
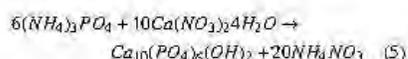
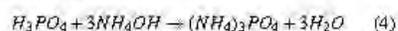


Table 3. Amount (pesos) necessary to produce 1 kg of nanophosphate calcium by using three different methods.

Synthesis method	Amount to produce 1 kg
Wei precipitate according to equation 1	\$812.68
Wei precipitate according to equation 2	\$2,685.00
Sol-gel employing equations 3 and 4	\$1,824.96
Dry method employing equation 5	\$3,832.93

Reactions for the sol-gel synthesis method according to Sanosh *et al.* (2009):



The last two reactions are consecutive, since they belong to the same method.

Reaction required for the dry method according to Fihri *et al.* (2017):



In the previous comparison it is clear that the most economical option turns out to be equation one (synthesis by wei chemical precipitation), however, for the eventual case that this nanoparticle is oriented to commercial application, a lower price will be necessary, so the production cost needs to be recalculated but using industrial grade reagents. By doing so, a decrease of 89.4% is achieved. In this way the nCF production cost will be \$ 85.90 / kg. This relative low price is in agreement with many agro inputs used as soil amendment or soil fertilizer.

4 Discussion

The results of this work agree with previous reports where the particle size of nCF is closely related to the speed of agitation during the reaction, for instance Afshar *et al.* (2003) pointed out that it is best to perform a powerful and high-speed mechanical agitation, therefore, the speed of agitation during the wei chemical synthesis reaction is a critical step in that process and has an impact on the performance of the reaction. In an analogous way, Azizieh *et al.* (2011) reported that by increasing the rotational speed, as a result of greater heat input, the grain size of

the base alloy increased and simultaneously more shattering effect of rotation was observed, causing a better nanoparticle distribution.

When performing the synthesis of magnetic NPs, Alvear *et al.* (2017) established a directly proportional relationship between the yield and the agitation speed of the reaction. Their results indicate that the production of Fe₃O₄ NPs occurs in accordance with the theory of nucleation and crystal growth, showing that increasing the speed of agitation rises the nucleation speed, and consequently the reaction performance. These authors also mention that a high speed of agitation tends to obtain smaller and more uniform particles, as it happened in the present work when performing the synthesis of the nCF. In this way it was demonstrated that the 1000 rpm agitation speed generated the maximum yield for both stirring types, and better uniformity in NPs size with average diameters of 15-20 nm.

In relation to the aforementioned, Salimi *et al.* (2012) studied the effect of agitation speed, type of agitation and temperature, on the size and morphology of nCF, but using the sol-gel technique. They found that by increasing the force of agitation, the dissipation energy of the system was increased, generating great turbulence in the mixing zone and increasing the nucleation rate, in addition, the large aggregates were fractionated. These results coincide with those obtained in the present work regarding particle size, since the mechanical agitation produced ~ 33% of particles with a diameter between 15-20 nm, while the magnetic agitation produced 29%. The range of particle sizes obtained for both types of agitation was 10 to 45 nm, however, the predominant size was 15 to 20 nm.

The present study reveals that nCF synthesis of by mechanical agitation produces the same quantity of precipitates (50 g / L of solution) as the magnetic agitation, therefore, both processes have a 100 % efficiency in the reaction, which may be due to the fact that the same speed is used. This is comparable with Alvear *et al.* (2017) and Yusoff *et al.* (2018), who

also found that the increase of energy in the system by mechanical agitation, induces that the reagents have better distribution in the solution, which causes greater nucleation due to the increase in collisions of the nuclei, thus improving the performance of the reaction and accelerating precipitation.

In this report the sample was dried at 110 °C because with that temperature it was possible to evaporate the residual moisture in less time, however, previous work suggests to calcinate the sample at high temperatures (~ 600-1200 °C) in order to increase the crystallinity of hydroxyapatite NPs (Meejoo *et al.*, 2006), by reducing the amount of water in the structure to increase the intensity and resolution of narrow diffraction peaks. Moreover, this can be associated with mass transport due to the coalescence of hydroxyapatite grains (Kamieniak *et al.*, 2017).

On the other hand, Abidi and Muraza (2013) studied the wet chemical precipitation reaction, finding that the optimum temperature for a stoichiometric ratio of hydroxyapatite NPs is 600 °C. An analogous result to that described above for thermal treatment of this type of NPs was reported by Sanosh *et al.* (2009). They incinerated the hydroxyapatite powders obtained by synthesis using the sol-gel technique, from 65 °C to 800 °C, thereby finding an increase in crystallite size from 18 nm to 61 nm. However, we believe that these high temperatures are not sustainable, since the costs of the process are increased considerably by the concept of energy for heating.

Regarding to the ZP response (Figure 8), the nCF obtained by means of mechanical and magnetic agitation, Mayoral *et al.* (2014) and Ortiz *et al.* (2016) point out that NPs in suspension with charges outside the range ± 30 mV are more stable due to the repulsion by the effect of surface charges, tending to repel each other which eludes aggregation, however, when the ZP values approach zero, agglomeration of nanoparticles is favored. On the other hand, NPs with a ZP between -10 and +10 mV are considered neutral, while NPs with ZP greater than +30 mV or less than -30 mV are considered strongly cationic and strongly anionic, respectively.

Since most cell walls and membranes are negatively charged, ZP can affect the tendency of NPs to penetrate the membranes, consequently, cationic NPs generally show a greater toxicity associated with the breakdown of the cellular wall (Clouston and Patri, 2011). According to that statement the NPs obtained in this trial will tend to agglomerate, because ZP values of -20 mV to -14 mV were obtained for mechanical

and magnetic agitation respectively, however, Berg *et al.* (2009) stated that this characteristic can be modified if the suspension is adapted, also affecting the dispersion and stability of the suspension.

The results showed that the obtained particles have a negative charge, in a similar way to soil clay, this indicates in turn that nCF would have the capacity to attract other soil nutrients in the form of cations such as Mg^{+2} , Na^{+2} , K^{+} and NH_4^+ , which supports to retain and maintain these elements on the ground for longer periods improving the nutrient status of plants and crops (Kotlegoda *et al.*, 2016).

Regarding the toxicity potential of NPs to humans and ecosystems, as nanoparticle size decreases, the surface to volume ratio increases exponentially, which make these particles more reactive and toxic, since by reducing their size, their ability to penetrate plant and animal tissues increases (Sajid *et al.*, 2015). Ionic dissolution and particle-induced generation of reactive oxygen species (ROS) are equally a significant mode of action for toxicity, while physical damage to cell membrane are associated to partially soluble Cobalt oxide NPs (Sharan *et al.*, 2019). ROS production may lead to an unspecific oxidation of cell membranes, proteins, nucleic acids, and chloroplast pigments. The accumulation of ROS is caused by an imbalance between ROS production and the capacity of the antioxidant system to inactivate them.

In plants, the root growth of radish, rape canola, ryegrass, lettuce, corn, and cucumber species were inhibited upon exposure to 2000 mg/L nano-sized Zn and ZnO. By applying nano-sized Zn (zinc, 35 nm) and ZnO (zinc oxide, 20 nm) the germination of ryegrass and corn was also inhibited (Nhan le *et al.*, 2015). In the case of the nCF, no scientific evidence was found on their probable phytotoxicity; on the contrary, nCF are used to immobilize heavy metals in the soil and water, preventing their absorption by plants (Geebelen *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2019).

According to Bala *et al.* (2014), there is a low possibility that the nCF generates bioaccumulation and / or phytotoxicity, since in its research with chickpea, the HRTEM mirrors detected only traces of the material in the treated plants with 1 mg/mL. It is believed that most of the nanoparticle applied was used by the tissues of the plant for their metabolic processes since it was observed an increase in the growth rate of the plant with respect to the control. For this reason, it is considered that the nanoparticles of nCF have great potential in the future of agriculture and more work is needed in this regard.

Conclusions

The present study provides evidence that the preparation of nCF can be feasible by simple low environmental impact procedures of reduced cost, without calcining the sample. Quantitative yields of nCF were achieved by means of wet precipitation using mechanical agitation to control the size of the nanoparticle. The process reported here could be scalable to produce nCF that has commercial potential as a nanofertilizer for the agricultural sector.

Acknowledgements

To project No. 268 from Fronteras de la Ciencia-CONACYT, as well to the Research Center for Applied Chemistry (CIQA) for the support granted by enabling its facilities to carry out this work. To Dr. Joelis Rodríguez-Hernández, to M.C. Bertha A. Puenie Urbina, to Dr. Carlos J. Espinoza González, to M.C. Layza A. Arizmendi Galaviz, to M.C. Beatriz Reyes Vielma and to M.C. Gladys de los Santos Villarreal, to all of them for their valuable help.

References

- Abidi, S.S.A., Murtaza, Q. (2013). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction. *Journal of Materials Science & Technology* 30, 307-310. Doi: 10.1016/j.jmst.2013.10.011
- Afshar, A., Ghorbani, M., Ehsani, N., Saeni, M.R., Sonell, C.C. (2003). Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials & Design* 24, 197-202. Doi: 10.1016/S0261-3069(03)00003-7
- Alvear, D., Galeas, S., Guenero, V.H., Debut, A. (2017). Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles. *Revista Politécnica* 39, 61-66. Doi: 10.1016/S0261-3069(03)00003-7
- Angelescu, N., Ungureanu, D.N., Anghelina, F.V. (2011). Synthesis and characterization of hydroxyapatite obtained in different experimental conditions. *Scientific Bulletin of Valahia University Materials and Mechanics* 6, 15-18.
- Asif, A.K.M.A.H., Hasan, M.Z. (2018). Application of nanotechnology in modern textiles: A review. *International Journal of Current Engineering and Technology* 8, 227-231. <https://doi.org/10.14741/ijcet/v.8.2.5>
- Azizieh, M., Kokabi, A.H., Abachi, P. (2011). Effect of rotational speed and probe profile on microstructure and hardness of AZ31/Al₂O₃ nanocomposites fabricated by friction stir processing. *Materials & Design* 32, 2034-2041.
- Bakan, F. (2018). Gene delivery by hydroxyapatite and calcium phosphate nanoparticles: A review of novel and recent applications. In *Hydroxyapatite-Advances in Composite Nanomaterials. Biomedical Applications and Its Technological Facets*. InTech.
- Bala, N., Dey, A., Das, S., Basu, R., Nandy, P. (2014). Effect of hydroxyapatite nanorod on chickpea (*Cicer arietinum*) plant growth and its possible use as nano-fertilizer. *Iranian Journal of Plant Physiology* 4, 1061-1069.
- Baiono, A., Ngaradoun, D., Youl, S., Lompo, F., Fening, J.O. (Eds.). (2018). *Improving the Profitability, Sustainability and Efficiency of Nutrients through Site Specific Fertilizer Recommendations in West Africa Agro-Ecosystems* (Vol. 1). Springer.
- Berg, J.M., Romoser, A., Banerjee, N., Zebda, R., Sayes, C.M. (2009). The relationship between pH and zeta potential of ~30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. *Nanotoxicology* 3, 276-283. Doi: 10.3109/17435390903276941
- Clogston, J.D., Patil, A.K. (2011). Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. *Humana Press* 2011, 63-70. Doi:10.1007/978-1-60327-198-1_6
- Ferreira, M.A.M., Filipe, J.A. (2018). Nanotechnology applications: The future arrived suddenly. *Computational Approaches in Biomedical Nano-Engineering*, 23-41.
- Fihri, A., Len, C., Varma, R.S., Solhy, A. (2017). Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coordination Chemistry Reviews* 347, 48-76. Doi: 10.1016/j.ccr.2017.06.009

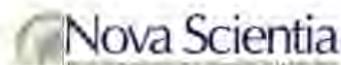
- Geebelen, W., Vangronsveld, J., Adriano, D.C., Carleer, R., Clijsters, H. (2002). Amendment-induced immobilization of lead in a lead-spiked soil: Evidence from phytotoxicity studies. *Water, Air, and Soil Pollution* 140, 261-277. Doi:10.1023/a:1020147901365
- Gheisari, H., Karamian, E., Abdellaji, M. (2015). A novel hydroxyapatite-hardisonite nanocomposite ceramic. *Ceramics International* 41, 5967-5975. Doi: 10.1016/j.ceramint.2015.01.033
- Guo, H., Jiang, C., Xu, Z., Luo, P., Fu, Z., Zhang, J. (2019). Synthesis of bitter melon-shaped nanoscaled hydroxyapatite and its adsorption property for heavy metal ions. *Materials Letters* 241, 176-179. Doi: 10.1016/j.matlet.2019.01.028
- Guzmán, V.C., Pina, B.C., Munguía, N. (2005). Stoichiometric hydroxyapatite obtained by precipitation and sol gel processes. *Revista Mexicana de Física* 51, 284-293.
- Helford, I.C.R. (1997). Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research* 35, 227.
- Izumi, F., Takuji, I. (2015). *Implementation of the Williamson-Hall and Halder-Wagner Methods into RIETAN-FP*. 2015, 33-38.
- Karnieniak, J., Kelly, P.J., Banks, C.E., Doyle, A.M. (2017). Mechanical, pH and thermal stability of mesoporous hydroxyapatite. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 28, 84-91. Doi: 10.1007/s10904-017-0652-3
- Kottegoda, N., Madusanka, N., Sandaruwan, C. (2016). Two new plant nutrient nanocomposites based on urea coated hydroxyapatite: Efficacy and plant uptake. *Indian Journal of Agricultural Science* 86, 494-9.
- 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, 73-78.
- Kottegoda, N., Sandaruwan, C., Priyadarshana, G., Siriwardhana, A., Rathnayake, U.A., Berugoda-Arachchige, D.M., Amaralunga, G.A. (2017). Urea-hydroxyapatite nanohybrids for slow release of nitrogen. *American Chemical Society, Nano* 11, 1214-1221. Doi: 10.1021/acsnano.6b07781
- Lopez-Bucio, J., de la Vega, O. M., Guevara-García, A., Herrera-Estrella, L. (2000). Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotechnology* 18, 450.
- Ma, M.G. (2012). Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity. *International Journal of Nanomedicine* 7, 1781. Doi: 10.2147/IJN.S29884
- Mayoral, J.B., Moreno, A.C., Martínez, E.S.M. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin American Journal of Physics Education* 8, 19-21.
- Meejoo, S., Maneeprakom, W., Winotai, P. (2006). Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. *Thermochemical Acta* 447, 115-120. Doi: 10.1016/j.tca.2006.04.013
- Mendoza-Castillo, D.I., Bonilla-Petriciolet, A., Jauregui-Rincon, J. (2016). Statistical analysis and modeling of multicomponent sorption of heavy metals in water using bone char. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 525-542.
- Mikolajczyk, A., Gajewicz, A., Rasulev, B., Schaeublin, N., Maurer-Gardner, E., Hussain, S., Puzyn, T. (2015). Zeta potential for metal oxide nanoparticles: a predictive model developed by a nano-quantitative structure-property relationship approach. *Chemistry of Materials* 27, 2400-2407. Doi: 10.1021/cm504406a
- Montalvo, D., McLaughlin, M.J., Degryse, F. (2015). Efficacy of hydroxyapatite nanoparticles as phosphorus fertilizer in andisols and oxisols. *Soil Science Society of America Journal* 79, 551-558. Doi: 10.2136/sssaj2014.09.0373
- Nhan le, V., Ma, C., Rui, Y., Liu, S., Li, X., Xing, B., Liu, L. (2015). Phytotoxic mechanism of nanoparticles: Destruction of chloroplasts and vascular bundles and alteration of nutrient absorption. *Scientific Reports* 5, 11618. Doi:10.1038/srep11618

- Okada, M., Matsumoto, T. (2015). Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications. *Japanese Dental Science Review* 51, 85-95.
- Ortiz-Zarama, M.A., Jiménez-Aparicio, A.R., Lourenço, R.V., Amaral-Sobral, P.J., Solorza-Feria, J. (2016). Rheological characterization of solutions of gelatin with bentonite and tannic acid. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 819-830.
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P.P., Dubey, N.K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control* 89, 1-11. Doi: 10.1016/j.foodcont.2018.01.018
- Rane, M., Bawskar, M., Rathod, D., Nagaonkar, D., Rai, M. (2015). Influence of calcium phosphate nanoparticles, *Piriformospora indica* and *Glomus mosseae* on growth of *Zea mays*. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 6, 1-8. Doi:10.1088/2043-6262/6/4/045014
- Sadaí, S.M., Khorasani, M.T., Dinpanah, K.E., Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia* 9, 7591-7621. Doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- Sajid, M., Ilyas, M., Basheer, C., Tariq, M., Daud, M., Baig, N., Shehzad, F. (2015). Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4122-4143.
- Salgado-Delgado, A.M., Vargas-Galarza, Z., Salgado-Delgado, R., García-Hernández, E., Hernández-Díaz, W.N., Rubio-Rosas, E., Salgado-Rodríguez, R. (2016). Morphological and thermal characterization of a high porous composite of biomaterial pHEMA-chitosan-ceramic (hydroxyapatite). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 625-632.
- Salimi, M.N., Bridson, R.H., Grover, L.M., Leeke, G.A. (2012). Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles. *Powder Technology* 218, 109-118. Doi: 10.1016/j.powtec.2011.11.049
- Sanosh, K.P., Chu, M.C., Balakrishnan, A., Kim, T.N., Cho, S.J. (2009). Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique. *Bulletin of Materials Science* 32, 465-470.
- Sattary, M., Rafienia, M., Kazemi, M., Salehi, H., Mahmoudzadeh, M. (2019). Promoting effect of nano hydroxyapatite and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polycaprolactone/gelatin scaffold for bone tissue engineering. *Material Science and Engineering C* 97, 141-155. Doi: 10.1016/j.msec.2018.12.030
- Saxena, M., Okram, G.S. (2018). Zeta potential study of Sb₂S₃ nanoparticles synthesized by a facile polyol method in various surfactants. In *AIP Conference Proceedings* 1953, 030092. AIP Publishing. Doi: 10.1063/1.5032427.
- Sharan, A., Nara, S. (2019). *Phytotoxic Properties of Zinc and Cobalt Oxide Nanoparticles in Algae. In Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*. Academic Press. 1-22.
- Sunandhakumari, V.J., Vidhyadharan, A.K., Alim, A., Kumar, D., Ravindran, J., Krishna, A., Prasad, M. (2018). Fabrication and *in vitro* characterization of bioactive glass/nano hydroxyapatite reinforced electrospun poly(epsilon-caprolactone) composite membranes for guided tissue regeneration. *Bioengineering (Basel)* 5. Doi:10.3390/bioengineering5030054
- Velasco-Rodríguez, V., Comejo-Mazón, M., Flores-Flores, J.O., Gutiérrez-López, G.F., Hernández-Sánchez, H. (2012). Preparation and properties of alpha-lipoic acid-loaded chitosan nanoparticles. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 155-161.
- Yang, Y., Chawla, A., Zhang, J., Esa, A., Jang, H.L., Khademhosseini, A. (2019). Applications of nanotechnology for regenerative medicine: healing issues at the nanoscale. In *Principles of Regenerative Medicine*. Academic Press 485-504. Doi: 10.1016/B978-0-12-809880-6.00029-1
- Yang, Y., Xu, S., Xu, G., Liu, R., Xu, A., Chen, S., Wu, L. (2019). Effects of ionic strength on physicochemical properties and toxicity

- of silver nanoparticles. *Science of the Total Environment* 647, 1088-1096.
- Yang, Z., Fang, Z., Tsang, P.E., Fang, J., Zhao, D. (2016). In situ remediation and phytotoxicity assessment of lead-contaminated soil by biochar-supported nHAP. *Journal of Environmental Management* 182, 247-251. Doi: 10.1016/j.jenvman.2016.07.079
- Yellen, A., Yilmaz, S. (2016). Various parameters affecting the synthesis of the hydroxyapatite powders by the wet chemical precipitation technique. *Materials Today: Proceedings* 3, 2869-2876. Doi: 10.1016/j.matpr.2016.07.006
- Yusoff, A.H.M., Salimi, M.N., Jamlos, M.F. (2018). Critical parametric study on final size of magnetic nanoparticles. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 318, 2-20. Doi: 10.1088/1757-899X/318/1/012020
- <https://www.chromospheres.com/nano-hydroxyapatite-powder/> Accessed: 01 March 2019

Artículo 2. (Enviado)

N° 00, Vol. 0 (0), 2018. ISSN 2007 – 0705, pp.: 00 - 00



Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxiapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*

Eduardo A. Flores-Hernández¹, Ricardo H. Lira-Saldívar^{*2}, Norma A. Ruiz-Torres³, Yatziry A. Guzman-Arroyo³, Alejandro Moreno-Reséndez, Norma Rodríguez-Dimas¹, Josué L. García-López⁴ y Mario García-Carrillo¹

Palabras clave: nanotecnología, nanofertilizante, nanopartículas de hidroxiapatita, *Raphanus sativus*

Keywords: nanotechnology, nanofertilizer, hydroxyapatite nanoparticles, *Raphanus sativus*

Recepción: 01-02-20XX / Aceptación: 01-02-20XX

[Los resúmenes de trabajos empíricos deben seguir esta estructura. Incluya el resumen en castellano e inglés, con no más de 450 palabras]

Resumen

Introducción: En la última década, la incorporación en la agricultura de nanopartículas (NPs) que funcionan como nanofertilizantes y nanoplaguicidas ha llamado mucho la atención por sus posibles efectos benéficos. La aplicación de fertilizantes a escala nanométrica representa una opción para mejorar el rendimiento agrícola y promover un uso eficiente y sustentable de los fertilizantes. Las nanopartículas de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (nHAp) son un material bioseguro que se puede aplicar como nanofertilizante a cultivos agrícolas.

Método: En esta investigación, se validó un proceso de síntesis de nHAp mediante precipitación química húmeda, así como el efecto de esas nanopartículas en la germinación de semillas y en el crecimiento de plántulas de rábano. Para la síntesis, se utilizó una solución acuosa de hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ y ácido orto fosfórico (H_3PO_4), con una relación estequiométrica de $\text{Ca/P} = 1.67$ con agitación mecánica a 1000 rpm. Los tratamientos aplicados (mg L^{-1}) fueron: 25 (T2), 50 (T3), 100 (T4), 200 (T5), 500 (T6) y 1000 (T7). Las semillas de testigo o control (T1) se trataron solo con agua destilada.

Resultados: La caracterización del polvo obtenido indica que se trata de nHAp con tamaño entre 10 – 45 nm. Los tratamientos con nHAp afectaron significativamente ($p \leq 0.01$) la germinación y vigor de las semillas, ya que se observó un efecto inhibitorio en el vigor de la germinación a 500 mg L^{-1} (T6) ya que esta variable se redujo en 11.83 % comparado con el tratamiento control (T1). Para la variable germinación (%) el tratamiento con 1000 mg L^{-1} mostró una reducción de 14.44 % contra el control. En cambio, con 200 mg L^{-1} (T5) la longitud de plúmula y radícula revelaron un

Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxiapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*

efecto promotor de crecimiento, con una diferencia positiva de 9,52 % y 7,59 % respectivamente, comparados con el tratamiento control.

Discusión o Conclusión: Las diferencias del efecto de las nHAp en la germinación y el crecimiento de las plántulas pueden estar determinadas por las características morfológicas y estructurales de las semillas, así como por el tamaño y concentración de las nanopartículas de hidroxiapatita. La relación entre el tamaño de las nHAp y su efecto en germinación y vigor de germinación en semillas de rábano no habían sido reportados hasta ahora, como tampoco se tenía registros de la relación entre el tamaño de las nHAp y el efecto promotor del crecimiento de las plántulas. En este trabajo se consignó que a menor tamaño de nanopartícula se requiere menor cantidad de nHAp para generar un efecto promotor del crecimiento en plántulas de rábano.

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna (UAAN-UL). Periférico Raúl López Sánchez S/N, Col. Valle Verde C.P. 27054, Torreón, Coahuila, México. Email: elohier@uaan.edu.mx

²Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Blvd. Enrique Reyna Hermosillo No.140 C.P. 25294, Saltillo, Coahuila, México. Email: hugo.lira@ciqa.edu.mx

³Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAN). Calzada Antonio Narro No. 1923, Buenavista, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

⁴Laboratorio de Química y Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Nuevo León C.P. 66050, México;

© Universidad De La Salle Bajío (México)

Abstract

Introduction: In the last decade, the incorporation in agriculture of nanoparticles (NPs) that function as nanofertilizers and nanoplaguicides has drawn much attention for their possible beneficial effects. The application of fertilizers on a nanometric scale represents an option to improve agricultural performance and promote efficient and sustainable use of fertilizers. Hydroxyapatite nanoparticles $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (nHAp) are a bio-safe material that can be applied as a nanofertilizer to agricultural crops.

Method: In this investigation, a nHAp synthesis process was validated by wet chemical precipitation, as well as the effect of these nanoparticles on the germination of seeds and on the growth of radish seedlings. For the synthesis, an aqueous solution of calcium hydroxide $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ and ortho phosphoric acid (H_3PO_4) was used, with a stoichiometric ratio of $\text{Ca} / \text{P} = 1.67$ with mechanical stirring at 1000 rpm. The treatments applied (mg L^{-1}) were: 25 (T2), 50 (T3), 100 (T4), 200 (T5), 500 (T6) and 1000 (T7). Control or control seeds (T1) were treated only with distilled water.

Flores-Hernández, Eduardo Arón *et al.*

Results: The characterization of the powder obtained indicates that it is nHAp with a size between 10-45 nm. The treatments with nHAp significantly affected ($p \leq 0.01$) the germination and vigor of the seeds, since an inhibitory effect on the germination vigor was observed at 500 mg L^{-1} (T6) since this variable was reduced by 11.83% compared to the control treatment (T1). For the germination variable (%) the treatment with 1000 mg L^{-1} showed a reduction of 14.44% against the control. In contrast, with 200 mg L^{-1} (T5) the length of the formula and radicle revealed a growth promoting effect, with a positive difference of 9.52% and 7.59% respectively, compared to the control treatment.

Discussion or Conclusion: Differences in the effect of nHAp on germination and seedling growth may be determined by the morphological and structural characteristics of the seeds, as well as by the size and concentration of the hydroxyapatite nanoparticles. The relationship between the size of the nHAp and its effect on germination and germination vigor in radish seeds had not been reported so far, nor were there records of the relationship between the size of the nHAp and the growth promoting effect of the seedlings. In this work it was reported that a smaller nanoparticle size requires a smaller amount of nHAp to generate a growth promoting effect in radish seedlings.

Introducción

Entre una amplia gama de posibles aplicaciones de la nanotecnología (NT) en la agricultura, hay un interés particular en el desarrollo de nuevos nano agroquímicos. Diversos autores han expresado algunas preocupaciones con respecto al riesgo potencial de esos nuevos nanoproducidos, pero muchos otros prevén su gran potencial para apoyar de manera sostenible al aumento requerido en la producción mundial de alimentos (Kah *et al.*, 2018).

La NT aplicada al sector agrícola promete optimizar el uso de los agroquímicos como plaguicidas y fertilizantes, ya que debido a su tamaño nano son requeridos en menores cantidades (Zulfiqar *et al.*, 2019), permitiendo reducir los costos y algunos efectos adversos por las menores cantidades que se aplican a los cultivos (Sun *et al.*, 2019). Además, las NPs pueden penetrar más fácilmente al interior de las plantas por las raíces y/o estomas, incrementando la fotosíntesis y produciendo más biomasa y rendimiento (Qureshi *et al.*, 2018).

Las nanopartículas de hidroxiapatita (nHAp) se han propuesto recientemente como un nuevo fertilizante de fósforo (P), ya que pueden proporcionar una mayor eficiencia y minimizar los impactos ambientales adversos de los fertilizantes convencionales (Xiong *et al.*, 2018). Las nHAp pueden actuar como fertilizante fosfatado en plantas de trigo (*Triticum aestivum*), lo cual se atribuye al hecho de que se movilizan con facilidad en el suelo y alcanzan las raíces de las plantas a través del flujo masivo de agua creado por la transpiración (Montalvo *et al.*, 2015).

El reporte de Taşkın *et al.* (2018) señala que la biomasa seca de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas en suelos calcáreos se incrementaron significativamente por el P contenido en las nHAp, siendo este tratamiento más efectivo que la fuente ordinaria de fertilizante usada (H_2PO_4 -P). En plantas de *Solanum lycopersicum*, Marchiol *et al.* (2019) encontraron que el alargamiento de la raíz debido a la aplicación de nHAp fue vigorosamente estimulado, además las plantas de tomate cultivadas en hidroponía no sufrieron efectos fitotóxicos. Con base en esos resultados los autores concluyeron que las nHAp tuvieron efectos promotores no tóxicos y, por lo tanto, podrían usarse como aportadores de P, así como de otros elementos y moléculas.

Flores-Hernández, Eduardo Arón *et al.*

Desde los inicios de la Revolución Verde impulsada en la década de 1960, el uso de fertilizantes químicos inorgánicos ha aumentado notablemente, contribuyendo a un aumento significativo de la producción mundial de alimentos. Sin embargo, las reservas existentes de roca fosfórica que se utilizan para fabricar los fertilizantes de P son finitas, habiéndose estimado que las reservas se habrán de agotar en los próximos 50–125 años (Cordell y White, 2015). Además, el incremento de 800 % en el precio de los fertilizantes fosfatados ocurrido en el año 2008, sirve como recordatorio de la interacción muy importante entre el P y la humanidad (Cordell *et al.*, 2009).

Por lo antes señalado, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivos evaluar el efecto de tratamientos de nHAp como fertilizante fosfatado y cálcico, en la germinación y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus*); además, se validó un proceso para la síntesis de nHAp, mediante una reacción sencilla de precipitación química húmeda.

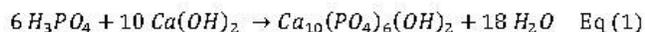
Método

Material vegetal

El genotipo de *R. sativus* empleado en este trabajo fue la variedad Champion, de polinización abierta, semilla de forma redonda, que produce alta calidad con bulbos extremadamente uniformes y tamaño grande, de color rojo brillante, siendo este cultivar excelente para el ciclo otoño-invierno, e ideal para el mercado de manojos.

Síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio (nHAp)

La síntesis de nHAp se realizó mediante un procedimiento similar al descrito por Kottegoda *et al.* (2011), empleando una solución acuosa de hidróxido de calcio [Ca(OH)₂] y ácido orto fosfórico (H₃PO₄), con una relación estequiométrica de Ca/P = 1.67. La mezcla se mantuvo en agitación constante y se calentó a 95 °C para activar la reacción química, la cual se ejecutó de acuerdo con la siguiente ecuación:



Una vez realizada la reacción de síntesis de nHAp, la solución resultante se dejó reposar durante 72 h hasta que el producto esperado se precipitó, observando la separación de fase al final del tiempo indicado.

Caracterización de las nHAp por difracción de Rayos X (XRD)

Las nHAp se examinaron mediante un difractómetro XRD (Rigaku, Ultima IV). Los patrones de difracción de XRD se registraron en un rango de 2θ de 10 a 80 °, obteniendo un tamaño de NPs en el rango de 10 a 45 nm. El cálculo para obtener el tamaño promedio de las partículas de cristalita, se realizó mediante el software instalado en ese equipo, empleando el método Halder-Wagner (Izumi y Takuji, 2015).

Caracterización de las nHAp con microscopio electrónico de transmisión (TEM)

La morfología y la microestructura de las nHAp se determinaron utilizando un microscopio FEI-TITAN 80-300 kV (Fisher Scientific, Hillsboro, OR, USA), operado a un voltaje de aceleración de 300 kV. Las muestras para estos análisis se prepararon depositando y evaporando una gota de la solución coloidal en rejillas de encaje de carbono y cobre. El procesamiento de micrografías de TEM se interpretó utilizando el software Digital Micrograph 3.7.0 (Gatan Software, Inc., Pleasanton, CA, USA). La descripción de las nHAp se realizó con imágenes de microscopía electrónica de transmisión y alta resolución (CTEM y HRTEM), así como por difracción de electrones (SAED).

Tratamientos

Las suspensiones con nHAp se prepararon con un tamaño entre 10 y 45 nm. La concentración inicial fue de 5000 mg L⁻¹, suspendida en agua desionizada estéril y dispersada durante 30 minutos con un sonicador Tianjing Autoscience AS2060 Instrumental Factory, Tianjing, China. La suspensión se diluyó y se aplicaron siete tratamientos: 0, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 mg L⁻¹.

Germinación de semillas y crecimiento de plántulas

Las semillas se contaron en lotes de 75 para cada tratamiento y se utilizaron pinzas de disección sin dientes para colocar las semillas en cajas Petri. Las semillas del tratamiento testigo o control (T1) se trataron solo con agua destilada. Los tratamientos se aplicaron por única vez durante la etapa de imbibición con una pipeta agregando 10 mL de suspensión de nHAp a las concentraciones mencionadas anteriormente para cada tratamiento. Las semillas de rábano se colocaron durante 4 h en una cámara de crecimiento para plantas, modelo Equitek EGCS 3S, 301 3SHR (Equitek, Guadalajara, México) a 25 ° C ± 2 ° C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Flores-Hernández, Eduardo Arón *et al.*

Una vez que se completó el período de imbibición de la semilla, se sembraron tres réplicas de 25 semillas por tratamiento en papel Anchor (Seedburo Equipment Company, Hidalgo, TX, U.S.A.). El papel Anchor se humedeció con agua destilada, luego se colocaron 25 semillas horizontalmente sobre el papel, con el embrión de la semilla ubicado hacia abajo; luego se humedeció otro papel del mismo tamaño para cubrir las semillas. Posteriormente, se plegaron en un rollo de 4 cm de ancho, se colocaron en cestas de polietileno de 20 cm de ancho x 45 cm de altura y se regresaron a la cámara de crecimiento durante 7 días.

El bioensayo se desarrolló de acuerdo con las normas de ISTA (2004). El vigor de germinación (V %) se determinó como el porcentaje de plántulas normales del número total de plántulas, y la tasa de germinación (G %), fue el porcentaje de semillas germinadas del número total de semillas registradas 4 días después de la siembra; la biomasa fresca por plántula se determinó después de los 7 días. Las plántulas normales fueron aquellas que tenían raíz y plúmula, cada una de ellas con un desarrollo total de 2.0 cm. La longitud de la plúmula se midió desde la intersección raíz-hipocótilo hasta la base del cotiledón, mientras que la longitud de la radícula se midió desde la base del hipocótilo hasta el ápice de la radícula. La biomasa fresca de plántulas normales se determinó al final del bioensayo con una balanza analítica.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar con siete tratamientos y tres repeticiones, el modelo lineal general fue $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$, donde la variable de respuesta es Y_{ij} , μ el promedio general, α_i el efecto de las concentraciones de nHAp y e_{ij} el error experimental. La unidad experimental consistió en un rollo de papel anchor que contenía 25 semillas. Las evaluaciones de los datos se evaluaron mediante análisis de varianza y la comparación promedio de los tratamientos mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (SPSS Statistics, 21 Version).

Resultados

Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita

Las nHAp se obtuvieron por agitación mecánica con un tamaño promedio entre 10 y 45 nm. Estas dimensiones están dentro del rango deseable para aplicaciones biomédicas, principalmente para

Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxiapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*

aplicaciones de tejido óseo (Sunandhakumari *et al.*, 2018; Sattary *et al.*, 2019) y para su estudio y práctica en la agricultura (Kottegoda *et al.*, 2017).

Síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio

La Figura 1 (a) muestra los patrones de difracción de rayos X del precipitado obtenido por agitación mecánica. Los resultados obtenidos concuerdan con las respuestas típicas con mayor intensidad en los picos (002, 211, 112, 300 y 202), caracterizando este polvo como un fosfato de calcio puro, según la base de datos internacional JCDPS 9-432 (Figura 1 (b)), confirmando así la formación de nHAp.

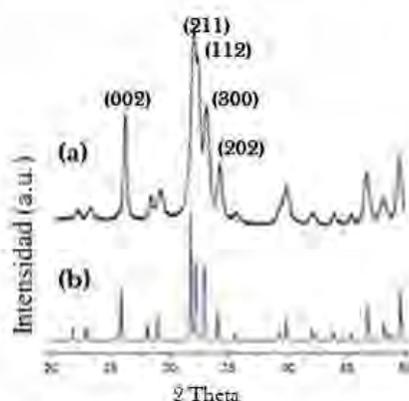


Figura 1. Los patrones de difracción de DRX de la muestra de polvo de nHAp obtenidos por (a) agitación mecánica y (b) el patrón de difracción estándar para HA según la carta JCPDS 9-432.

Nuestros resultados muestran que la agitación mecánica arroja tamaños de cristalita de 15.2 ± 1.3 nm, este cálculo se desarrolló de acuerdo con el método de Halder-Wagner (Izumi y Takuji, 2015) y el software instalado en el difractómetro.

Para evaluar los resultados anteriores, se realizó un análisis de muestra utilizando el microscopio TEM, la Figura 2 (a) muestra la imagen TEM de un nHAp sintetizado con agitación mecánica. En esta micrografía se observa una forma de varilla alargada de NPs. La Figura 2 (b) muestra la distribución de los tamaños de nHAp después de medir más de 300 nanopartículas. La mayoría (~65%) de las NPs mostraron diámetros de 10 a 25 nm, pero solo ~4% exhibieron tamaños superiores

Flores-Hernández, Eduardo Arón *et al.*

a 35 nm. La Figura 2 (c) muestra una imagen representativa de HRTEM, donde se aprecia claramente el diámetro de la molécula con un valor medio de 19.13 nm. Este resultado concuerda con la frecuencia de tamaño promedio observada en el esquema del panel 2 (b). El patrón de difracción SAED obtenido del área observada en el panel (a), se muestra en la Figura 2 (d). Este patrón está formado por anillos irregulares asociados con los planos (211, 102, 201 y 200) de la estructura de nHAp.

El análisis de la imagen para determinar el diámetro principal de cada proceso se realizó utilizando imágenes TEM midiendo al menos 300 nanopartículas. Para determinar la distribución del tamaño de partícula a partir de las imágenes CTEM, se realizó el siguiente procedimiento: 1) Utilizando el software Image Pro-10 (Media Cybernetics Inc., Version 10.0.3., Rockville, Maryland, USA), se midió el diámetro medio de más de 300 NPs. 2) A partir de los datos obtenidos, se determinó la frecuencia absoluta para rangos de diámetros típicos. 3) Con los datos anteriores expresados como porcentaje, se crearon los histogramas presentados en la Fig. 2 (b).

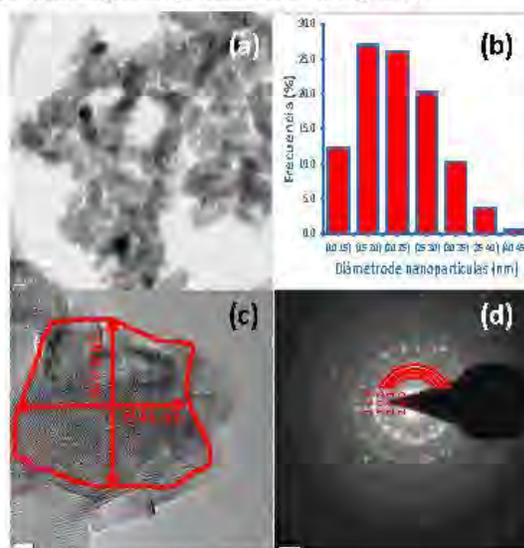


Figura 2. Micrografías correspondientes a la muestra de nHAp. Imagen TEM (a). Distribución del tamaño de las NPs (b). Imagen HRTEM de una nanopartícula (c). Patrón de difracción SAED obtenido del área observada en el panel a (d).

Con respecto a la morfología de las nanopartículas, en la agitación mecánica predominaron las nanopartículas en forma de varilla, que tienen un tamaño entre 15 y 25 nm; que está de acuerdo con Alvear *et al.* (2017), ya que estos autores informaron que la velocidad de agitación en el caso de la agitación mecánica indujo tamaños de partículas más pequeños.

Efecto de las nanopartículas de HAp en la germinación y vigor de las semillas

En la Figura 3 se muestra el efecto de las nanopartículas de HAp sobre las variables asociadas al crecimiento de plántula en semillas de *R. sativus*.

El efecto de las nanopartículas de hidroxiapatita aplicadas a las semillas de *R. sativus* tuvieron una diferencia estadística significativa en el vigor y porcentaje de germinación, ya que todos los tratamientos mostraron una disminución en estas variables. Se observa un posible efecto inhibitor del vigor de la germinación probablemente por un efecto fitotóxico con la representación más clara a los 500 mg L⁻¹ con un valor de 82 %, mientras que el control mostro un valor de 93 %, esto significa una reducción del 11.83 % contra el tratamiento control, como lo muestra la Figura 3 (c). Para el porcentaje de germinación el tratamiento de 1000 mg L⁻¹ mostro el porcentaje de germinación más bajo, con un valor de 77 % contra el 90 % del tratamiento control, esto significó una reducción de 14.44 %, como lo muestra la Figura 3 (d). Se observa claramente la toxicidad generada por las nanopartículas de hidroxiapatita en las semillas durante el proceso de imbibición.

Longitud de plúmula, radícula y biomasa seca

Para el caso de longitud de vástago en plántulas de *R. sativus* se observó el máximo incremento de longitud con el tratamiento de 200 mg L⁻¹, mostrando una longitud de 7.71 cm contra 7.04 cm del tratamiento control, esto representa una diferencia de 9.52, de acuerdo con la Figura 3 (b). El tratamiento de 25 mg L⁻¹ mostro un efecto inhibitor al mostrar el valor mínimo de longitud con 6.74 cm, lo que representa una diferencia negativa del 4.26 %.

De manera similar a lo antes expuesto, en el caso de la longitud de radícula el mejor tratamiento resulto ser el de 200 mg L⁻¹, con una diferencia positiva en la longitud de 7.59% contra el control, mientras que el tratamiento de 25 mg L⁻¹ mostro un efecto inhibitor del crecimiento con una diferencia negativa de 8.94 % con respecto del control, tal como se observa en la Figura 3 (a).

Flores-Hernández, Eduardo Arón *et al.*

Por su parte, el peso seco mostro incrementos en la mayoría de los tratamientos, excepto con el tratamiento de 200 mg L⁻¹ que mostro una ligera disminución del 0.48% con respecto al control, mientras que el mejor tratamiento para este parámetro resulto ser el de 1,000 mg L⁻¹ con un incremento de 19.66 % con respecto al control, como se muestra en el Cuadro 1.

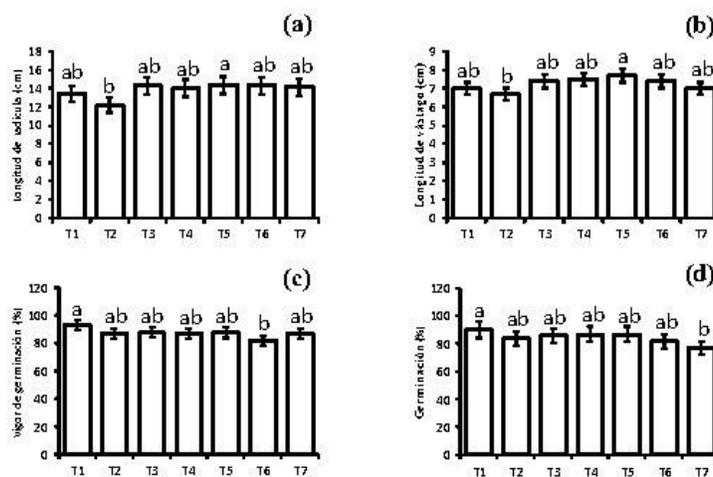


Figura 3. Efecto de nanopartículas de hidroxiapatita en semillas y plántulas de *Rapahus sativus*. (a) Longitud de radícula, (b) Longitud de hipocótilo o vástago, (c) Vigor de germinación de semillas y (d) Porcentaje de germinación de semillas.

Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxiapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*

Cuadro 1. Comparación de medias para la biomasa seca de plántulas de *Raphanus sativus* tratadas con nanopartículas de hidroxiapatita

Dosis aplicada de nHAp	Peso Seco
(mg L ⁻¹)	(mg plántula ⁻¹)
0	6758±506.95 b
25	7102±532.75 ab
50	6813±511.07 b
100	7088±531.70 ab
200	6725±504.47 b
500	7034±527.65 ab
1000	8086±606.57 a
Media	7086
Tukey (α=0.05)	1222

Medias con la misma literal son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

Discusión

En las próximas décadas los sistemas alimentarios mundiales tendrán el desafío de proporcionar seguridad alimentaria a una población mundial en crecimiento sin afectar la seguridad ambiental.

El uso de tecnologías modernas aplicadas a los agroecosistemas será necesario para asegurar el suministro de alimentos y minimizar impactos negativos sobre el medio ambiente. La combinación de biotecnología y nanotecnología tiene el potencial de revolucionar los sistemas agrícolas al desarrollar fertilizantes inteligentes con liberación controlada de nutrientes, capaces de solucionar problemas actuales y futuros de seguridad alimentaria (Calabi-Floody *et al.*, 2018).

Sin embargo, se considera que muchas propiedades de las nanopartículas tienen un riesgo potencial para la salud humana y las plantas, en las cuales se han observado efectos en la germinación, crecimiento de plántula, citotoxicidad y genotoxicidad (Antisari *et al.*, 2018), por lo que se recomienda desarrollar estrategias para evaluar y gestionar los riesgos que conlleva el uso de esta tecnología, así como también encontrar formas sostenibles de fabricar nanomateriales para su uso en la agricultura (Raliya *et al.*, 2017).

Flores-Hernández, Eduardo Arón *et al.*

La toxicidad de las nanopartículas puede explicarse de dos maneras: (a) toxicidad por la composición química, por ejemplo, liberación de iones metálicos tóxicos, e (b) inhibición o estimulación causada por la morfología, estructura, y/o tamaño de las nanopartículas. (Lee *et al.*, 2010; Manke *et al.*, 2013).

Relacionado con lo anterior, Rui *et al.* (2017), realizaron un trabajo donde evaluaron NPs Ag en maní (*Arachis hypogaea* L.), observándose que estas NPs inhibieron notablemente el crecimiento de las plantas y la formación de vainas. Los tratamientos de 500 y 2000 mg kg⁻¹ disminuyeron en un 21.92 y 29.66% respectivamente la altura de planta en comparación con el control mientras que para la biomasa fresca y seca se mostró una respuesta de acuerdo con la dosis, reduciéndose el rendimiento por planta en 86.62 y 90.63% respectivamente, lo que puede estar relacionado con la inhibición por el tamaño de la partícula.

Otros estudios con NPs de óxidos metálicos (CuO, NiO, TiO₂, óxido de hierro (Fe₂O₃) y Co₃O₄) redujeron la germinación de semillas de lechuga, rábano (*Raphanus sativus* L.) y pepino mediante la adsorción de estas sobre las superficies de las semillas y la liberación de iones metálicos, señalando que los efectos tóxicos de las NPs sobre la germinación de semillas varían con los cultivos y el tamaño de la semilla (Rizwan *et al.*, 2017).

Otros estudios muestran los efectos adversos de las nanopartículas metálicas en diversos cultivos, por ejemplo, Landa *et al.* (2016) en su trabajo evaluaron el efecto de NPs ZnO en semillas de *Sinapis alba* L., encontraron un efecto tóxico debido al Zn iónico (Zn²⁺) liberado por las NPs en el medio de cultivo, sus resultados mostraron que 1000 mg L⁻¹ de ZnO libera 7.90–11.42 mg L⁻¹ Zn²⁺ y reduce el crecimiento de raíz en 35.5–41.8%, lo que indica en este caso, que el efecto inhibitor depende de la dosis aplicada.

Jain *et al.* (2017), evaluaron la fitotoxicidad de NPs ZnO en mijo perla (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y trigo (*Triticum aestivum* L.) seleccionando estos cultivos por ser representativos de zonas áridas, vegetales y cereales respectivamente, además de analizar el efecto de las NPs sobre las características de las semillas como su tamaño y anatomía superficial. Sus resultados mostraron que una concentración de 1,000 mg L⁻¹ redujo la germinación

Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxiapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*

en 18, 30 and 60% para el mijo perla, tomate y trigo respectivamente. Se descubrió que el mijo perla (planta xerofítica), debido a la presencia de una cutícula gruesa y lisa en la testa, era relativamente menos sensible a las nanopartículas de ZnO en comparación con el trigo y el tomate (plantas mesofílicas) que tienen una capa de semilla relativamente delgada y arrugada.

Los pliegues en la semilla pueden ayudar a que las NPs se fijen y se mejore la posibilidad de interacción con las NPs, al aumentar la atracción electrostática y las interacciones hidrofóbicas en la superficie de la semilla afectando la fitotoxicidad (Wu *et al.*, 2012).

La cubierta de una semilla se desarrolla principalmente a partir de los tegumentos interno y externo del rudimento seminal, los cuales se convertirán en el tegmen y la testa de la semilla, respectivamente. El tegmen por lo general es delgado y flexible, mientras que la testa es dura (Megias *et al.*, 2015). En la superficie de la testa existe una capa de células a modo de epidermis que desarrollan una cutícula que supone una barrera física para el agua y agentes externos como las nanopartículas, pero es semipermeable a los gases. Histológicamente hay una gran variedad en la organización de la cubierta de las semillas según las diferentes especies de plantas (Bewley *et al.*, 2013).

Se sabe que la forma, tamaño y arquitectura de semilla afectan varios aspectos en la evolución de una planta. Especies de semillas pequeñas han evolucionado para producir grandes cantidades de prole, pero pocas completan su ciclo de vida; sucediendo lo contrario con las especies de semillas grandes, que producen pocas semillas, pero sus plántulas generalmente son suficientemente robustas para asegurar que la mayoría complete su ciclo de vida (Borisjuk *et al.*, 2013).

El rábano es un vegetal subterráneo, su fase vegetativa consiste en 35 días y la fase reproductiva de 50 días (Singh y Kumar. 2018). Sus tejidos comestibles entran en contacto directo con el suelo y, en consecuencia, con los contaminantes que puedan estar presentes, por ejemplo, material nano particulado, existiendo el riesgo de acumulación en sus tejidos comestibles en altas concentraciones. Un estudio demostró que rábano crecido en un suelo arenoso arcilloso con 250 y 500 mg kg⁻¹ de NPs de CeO₂ acumularon altas concentraciones de Ce. Otro trabajo similar mostro que el rábano tratado con 500 mg kg⁻¹ acumuló una concentración diez veces mayor de Ce

Flores-Hernández, Eduardo Arón *et al.*

predominantemente en la periderma pigmentada de las raíces de almacenamiento en comparación con el control, lo que plantea riesgos potenciales para la exposición humana (Zhang *et al.*, 2017).

Las NPs derivadas de metales y óxidos metálicos han mostrado reducir o mejorar la germinación de semillas de muchas plantas. La respuesta de estas plantas varió significativamente entre el tipo de NPs y se correlacionó parcialmente con la dosis y el tamaño de las NPs. Sin embargo, los mecanismos detrás de la germinación aún no se conocen bien, especialmente en el suelo (Rizwan *et al.*, 2017).

Para el caso de las NPs de hidroxiapatita, existen a la fecha dos trabajos que trataron de evidenciar el posible efecto fitotóxico de dichas NPs, sin embargo, sus resultados indican que este efecto es nulo para diferentes cultivos. De acuerdo con Bala *et al.* (2014), es poco probable que nHAp genere fitotoxicidad, pues en su trabajo con *Cicer arietinum* (garbanzo), se observó un aumento en la tasa de crecimiento de la planta con respecto al control y solo se detectaron trazas del material en los tejidos de las plantas tratadas con 1 mg mL^{-1} a través de micrografías HRTEM, por lo que se cree que la mayor parte de las NPs aplicadas fueron utilizadas por la planta para sus procesos metabólicos. Por otro lado, Marchiol *et al.* (2019), reporta que las nHAp no tuvieron efectos fitotóxicos en plantas de tomate cultivadas en hidroponía. Sus resultados muestran que el porcentaje de germinación no se vio afectado por ninguna concentración aplicada, mientras que la elongación de raíz sí se vio claramente afectada, siendo el mejor tratamiento a 500 mg L^{-1} con un aumento del 97% con respecto al control.

A pesar de la similitud entre los resultados de los trabajos anteriormente señalados, existen diferencias entre la morfología y tamaño de las nanopartículas aplicadas, por ejemplo, Bala *et al.* (2014) utilizó nHAp en forma de varilla con una longitud entre 40 y 80 nm y un diámetro entre 15 a 30 nm, mientras que Marchiol *et al.* (2019) utilizó nHAp con forma de platos irregulares con tamaños entre 94 a 163 nm. Para este trabajo las nHAp utilizadas tenían forma de varilla con una longitud entre 10 a 25 nm y un diámetro promedio de 19.13 nm.

De acuerdo con estas observaciones, es evidente que, de los tres trabajos, en el presente se utilizaron las nHAp con el menor tamaño, y también donde se presentó un efecto adverso en la semilla al inhibirse la germinación y vigor de germinación de todos los tratamientos, contrario a lo observado por Bala *et al.* (2014) y Marchiol *et al.* (2019). De acuerdo con Rizwan *et al.* (2017), este resultado

Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxiapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*

es propio de NPs metálicas, donde existe una correlación parcial entre la respuesta de una planta con la dosis y el tamaño de las NPs aplicadas, sin embargo, hasta ahora no se había reportado este comportamiento en nanopartículas de hidroxiapatita, mostrándose por primera vez un efecto fitotóxico relacionado con el tamaño de estas.

Mientras que para Bala *et al.* (2014) el mejor tratamiento fue a 1000 mg L⁻¹ y para Marchiol *et al.* (2019) el mejor tratamiento fue a 500 mg L⁻¹ para nosotros el mejor tratamiento fue a 200 mg L⁻¹, ya que las plántulas de *R. sativus* mostraron un incremento en el crecimiento de el vástago y la radícula de 9.52% y 7.59% respectivamente contra el tratamiento control. Este resultado muestra que la eficiencia de las nHAp como nanofertilizante está relacionado también con el tamaño de las NPs, lo cual tampoco había sido reportado previamente para este compuesto en particular.

Conclusiones

El presente estudio muestra evidencia de un efecto nocivo en las semillas de rábano por la aplicación de distintas concentraciones de nHAp. La germinación y el vigor de germinación fueron inhibidos por dosis moderadas de esta nanopartícula, mientras que la plántula de esta especie mostro un efecto promotor de crecimiento.

Los efectos adversos pueden estar relacionado con la morfología de las semillas, entendiéndose que a pesar de que la nHAp contiene P en su composición, y este elemento es uno de los principales nutrimentos necesarios para el desarrollo de cultivos, el tamaño nanométrico y la concentración pueden estar afectando a nivel celular los procesos fisiológicos de los mismos.

Se recomienda la realización de estudios más profundos para evaluar los efectos de las NPs y su interacción con en el suelo y las diferentes partes de las plantas a fin de identificar los mecanismos de toxicidad de NP en las plantas y el suelo.

Agradecimientos

Al proyecto No. 268 de Fronteras de la Ciencia-CONACYT, así como al Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA) por el apoyo otorgado al permitir que en sus instalaciones se realice este trabajo. A el Dr. Joelis Rodríguez Hernández, a M.C. Bertha A. Puente Urbina, a M.C. Beatriz Reyes Vielma y M.C. Gladys de los Santos Villarreal, a todos ellos por su valiosa ayuda.

Referencias

- Alvear, D., Galeas, S., Guerrero, V.H., Debut, A. (2017). Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles. *Revista Politécnica* 39, 61-66. Doi: 10.1016/S0261-3069(03)00003-7
- Antisari, L.V., Carbone, S., Bosi, S., Gatti, A., Dinelli, G. (2018). Engineered nanoparticles effects in soil-plant system: Basil (*Ocimum basilicum* L.) study case. *Applied soil ecology* 123, 551-560.
- Bala, N., Dey, A., Das, S., Basu, R., Nandy, P. (2014). Effect of hydroxyapatite nanorod on chickpea (*Cicer arietinum*) plant growth and its possible use as nano-fertilizer. *Iranian Journal of Plant Physiology* 4(3), 1061-1069.
- Bewley, J.D., Bradford, K., Hilhorst, H., Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. New York: *Springer*. Doi: 10.1007/978-1-4614-4693-4
- Borisjuk, L., Neuberger, T., Schwender, J., Heinzel, N., Sunderhaus, S., Fuchs, J. (2013). Seed architecture shapes embryo metabolism in oilseed rape. *Plant Cell* 25, 1625–1640. Doi: 10.1105/tpc.113.111740
- Calabi-Floody, M., Medina, J., Rumpel, C., Condon, L.M., Hernandez, M., Dumont, M., de la Luz Mora, M. (2018). Smart fertilizers as a strategy for sustainable agriculture. In *Advances in Agronomy*, 147, 119-157. Academic Press.
- Cordell, D., White, S. (2015). Tracking phosphorus security: indicators of phosphorus vulnerability in the global food system. *Food Security* 7(2), 337-350.
- Cordell, D., Drangert, J.O. y White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19(2): 292–305.
- Izumi, F., Takuji I. (2015). Implementation of the Williamson-Hall and Halder-Wagner Methods into RIETAN-FP. 2015, 33-38.
- Jain, N., Bhargava, A., Pareek, V., Akhtar, M.S., Panwar, J. (2017). Does seed size and surface anatomy play role in combating phytotoxicity of nanoparticles? *Ecotoxicology* 26(2): 238-249.

Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxiapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*

- Kah, M., Kookana, R.S., Gogos, A., Bucheli, T.D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature nanotechnology* 13(8), 677.
- Kottegoda, N., Madusanka, N., Sandaruwan, C. (2016). Two new plant nutrient nanocomposites based on urea coated hydroxyapatite: Efficacy and plant uptake. *Indian J. Agr. Sci* 86, 494-9.
- 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, 73-78.
- Kottegoda, N., Sandaruwan, C., Priyadarshana, G., Siriwardhana, A., Rathnayake, U.A., Berugoda-Arachchige, D. M., Amaratunga, G.A. (2017). Urea-hydroxyapatite nanohybrids for slow release of nitrogen. *American Chemical Society, Nano* 11, 1214-1221. Doi: 10.1021/acsnano.6b07781
- Landa, P., Cyrusova, T., Jerabkova, J., Drabek, O., Vanek, T., Podlipna, R. (2016). Effect of metal oxides on plant germination: phytotoxicity of nanoparticles, bulk materials, and metal ions. *Water, Air, & Soil Pollution* 227(12), 448.
- Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.C., Braam, J., Alvarez, P.J. (2010). Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 29(3), 669-675.
- Manke, A., Wang, L., Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international* 2013.
- Marchiol, L., Filippi, A., Adamiano, A., Degli Esposti, L., Iafisco, M., Mattiello, A., Braidot, E. (2019). Influence of Hydroxyapatite Nanoparticles on Germination and Plant Metabolism of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Preliminary Evidence. *Agronomy* 9(4): 161. Doi: 10.3390/agronomy9040161.
- Megias, M., Molist, P., Pombal, M.A. (2015). Atlas de Histología Vegetal y Animal: Órganos vegetales. Semilla. Recuperado de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/o-v-semilla.pdf>
- Montalvo, D., McLaughlin, M. J., Degryse, F. (2015). Efficacy of hydroxyapatite nanoparticles as phosphorus fertilizer in andisols and oxisols. *Soil Science Society of America Journal* 79(2). Doi: 10.2136/sssaj2014.09.0373.

- Qureshi, A., Singh, D.K. y Dwivedi, S. (2018). Nano-fertilizers: a novel way for enhancing nutrient use efficiency and crop productivity. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 7(2), 3325-3335.
- Raliya, R., Saharan, V., Dimkpa, C., Biswas, P. (2017). Nanofertilizer for precision and sustainable agriculture: current state and future perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry* 66(26), 6487-6503.
- Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M.F., Ok, Y.S., Adrees, M., Ibrahim, M., Abbas, F. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *J Hazard Mater* 322(Pt A), 2-16. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.061
- Rui, M., Ma, C., Tang, X., Yang, J., Jiang, F., Pan, Y., Xing, B. (2017). Phytotoxicity of silver nanoparticles to peanut (*Arachis hypogaea* L.): physiological responses and food safety. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 5(8): 6557-6567. Doi: 10.1021/acssuschemeng.7b00736.
- Sattary, M., Rafienia, M., Kazemi, M., Salehi, H., Mahmoudzadeh, M. (2019). Promoting effect of nano hydroxyapatite and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polycaprolactone/gelatin scaffold for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 97, 141-155. Doi: 10.1016/j.msec.2018.12.030
- Singh, D., Kumar, A. (2018). Investigating long-term effect of nanoparticles on growth of *Raphanus sativus* plants: a trans-generational study. *Ecotoxicology* 27(1), 23-31.
- Sun, Y., Liang, J., Tang, L., Li, H., Zhu, Y., Jiang, D., Zeng, G. (2019). Nano-pesticides: A great challenge for biodiversity? *Nano Today* 100757.
- Sunandhakumari, V.J., Vidhyadharan, A.K., Alim, A., Kumar, D., Ravindran, J., Krishna, A., Prasad, M. (2018). Fabrication and In Vitro Characterization of Bioactive Glass/Nano Hydroxyapatite Reinforced Electrospun Poly(epsilon-Caprolactone) Composite Membranes for Guided Tissue Regeneration. *Bioengineering (Basei)* 5(3). Doi:10.3390/bioengineering5030054.
- Taşkın, M.B., Şahin, Ö., Taskin, H., Atakol, O., Inal, A., Gunes, A. (2018). Effect of synthetic nano-hydroxyapatite as an alternative phosphorus source on growth and phosphorus nutrition of lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Journal of Plant Nutrition* 41(9): 1148-1154.

Efectos del tamaño y morfología de nanopartículas de hidroxiapatita en la germinación y crecimiento de plántulas de *Raphanus sativus*

- Wu, S.G., Huang, L., Head, J., Chen, D.R., Kong, I.C., Tang, Y.J. (2012). Phytotoxicity of metal oxide nanoparticles is related to both dissolved metals ions and adsorption of particles on seed surfaces. *J Pet Environ Biotechnol* 3(4), 126.
- Xiong, L., Wang, P., Hunter, M.N., Kopittke, P.M. (2018). Bioavailability and movement of hydroxyapatite nanoparticles (HA-NPs) applied as a phosphorus fertilizer in soils. *Environmental Science: Nano* 5(12): 2888-2898.
- Zhang, W., Musante, C., White, J. C., Schwab, P., Wang, Q., Ebbs, S.D., Ma, X. (2017). Bioavailability of cerium oxide nanoparticles to *Raphanus sativus* L. in two soils. *Plant physiology and biochemistry* 110, 185-193.
- Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N.A., Munné-Bosch, S. (2019). Nanofertilizer use for sustainable agriculture: advantages and limitations. *Plant Science* 110270.

Artículo 3. (Patente registrada)

MX/a/2019/013018

gob.mx	
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial	
REPRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD DE REGISTRO DE PATENTE ENVIADA A TRAVÉS DEL PORTAL DE ACCESO A SERVICIOS ELECTRÓNICOS (PASE).	
Homoclave del formato	Folio
IMPI-00-009	Folio: MX/E/2019/074893
Fecha de publicación en el DOF	Fecha de solicitud del trámite
24 05 2018	31 10 2019
Datos generales de la solicitud	
<input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente Normal <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial Especifique cual: <input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial	Expediente: MX/a/2019/013018 ID Solicitud: 18767 Fecha: 31/10/2019 03:22:16
Datos del (de los) solicitante(s)	
Personas físicas	Personas morales
CURP:	RFC: CIQ7611022G2
Nombre(s):	Denominación o razón social: CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Primer apellido:	Nacionalidad: MÉXICO
Segundo apellido:	Teléfono (Lada, Número, Extensión): 8444389830
Nacionalidad:	Correo electrónico: propiedad.industrial@ciqa.edu.mx
Teléfono (Lada, Número, Extensión):	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo
Correo electrónico:	<input type="radio"/> Continúa en anexo

MÉXICO
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

SE
SECRETARÍA DE ECONOMÍA

COFEMER
COMISIÓN FEDERAL DE REGISTRO Y PROTECCIÓN DE MARCAS

IMPI
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

Contacto:
 Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan,
 Xochimilco, 16020, Ciudad de México.
 Teléfono: (55) 53340700
www.gob.mx/mpi

Página 1 de 6

gob.mx	
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial	
Domicilio del (de los) solicitante(s)	
Código postal: 25294	
Calle: BLVD. ENRIQUE REYNA HERMOSILLO	
Número exterior: 140	Número interior:
Colonia: SAN JOSÉ DE LOS CERRITOS	
Municipio o delegación: SALTILLO	Localidad:
Estado o entidad federativa: COAHUILA	Entre calles:
País: MÉXICO	

Datos del (de los) inventor(es) /diseñador(es)	
CURP: FOHE790204HCLLRD08	
Nombre(s): Eduardo Arón	
Primer apellido: FLORES	
Segundo apellido: HERNÁNDEZ	
Nacionalidad: MÉXICO	
Teléfono (Lada, Número, Extensión):	
Correo electrónico:	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo

Domicilio del (de los) inventor(es)/diseñador(es)	
Código postal: 25294	
Calle: BLVD. ENRIQUE REYNA HERMOSILLO	
Número exterior: 140	Número interior:
Colonia: SAN JOSÉ DE LOS CERRITOS	
Municipio o delegación: SALTILLO	Localidad:
Estado o entidad federativa: COAHUILA	Entre calles:
País: MÉXICO	

   	<p>Contacto: Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México. Teléfono: (55) 53340700 www.gob.mx/impi</p>
---	--

gob.mx		
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial		
Datos del (de los) apoderado(s)		
CURP: ROFO610725HCLDR01	RGP:	
Nombre(s): Oliverio Santiago	Personas autorizadas para oír/recibir notificaciones: Janeth Adriana PÉREZ CHANTACO, Herminia Soledad CERDA Y MENESES	
Primer apellido: RODRIGUEZ		
Segundo apellido: FERNANDEZ		
Nacionalidad: MÉXICO		
Teléfono (Lada, Número, Extensión): 8444389830		
Correo electrónico: propiedad.industrial@ciqa.edu.mx © Continúa en anexo		
Domicilio del (de los) apoderado(s)		
Código postal: 25294		
Calle: BLVD. ENRIQUE REYNA HERMOSILLO		
Número exterior: 140	Número interior:	
Colonia: SAN JOSÉ DE LOS CERRITOS		
Municipio o delegación: SALTILLO	Localidad:	
Estado o entidad federativa: COAHUILA	Entre calles:	
País: MÉXICO		
Datos de la Solicitud		
Denominación o título de la invención: PROCESO DE SÍNTESIS PARA LA OBTENCIÓN DE NANOFERTILIZANTES BI-ENCAPSULADOS DE LENTA LIBERACIÓN PARA SU APLICACIÓN EN EL SECTOR AGROPECUARIO		
Fecha divulgación previa:		
Divisional de la solicitud		
Fecha presentación:		
Número:		
Figura jurídica:		
Prioridad Reclamada		
País:	Fecha de Presentación:	Número de Serie:
		
Contacto: Arenal #050, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México. Teléfono: (55) 33340700 www.gob.mx/impi		

gob.mx

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Lista Inventores/Diseñadores

Inventor/Diseñador 2

- Nombre: Ricardo Hugo LIRA SALDÍVAR
 - CURP: LISR490504HNLR05
 - Nacionalidad: MÉXICO
 - Domicilio: Calle BLVD. ENRIQUE REYNA HERMOSILLO, Ext. 140, Col. SAN JOSÉ DE LOS CERRITOS, C. P. 25294
 - Población, Estado y País: SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

Inventor/Diseñador 3

- Nombre: Layza Alejandrina ARIZMENDI GALAVIZ
 - CURP: AIGL800903MSRLY0
 - Nacionalidad: MÉXICO
 - Domicilio: Calle BLVD. ENRIQUE REYNA HERMOSILLO, Ext. 140, Col. SAN JOSÉ DE LOS CERRITOS, C. P. 25294
 - Población, Estado y País: SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

Inventor/Diseñador 4

- Nombre: Carlos José ESPINOZA GONZÁLEZ
 - CURP:
 - Nacionalidad: NICARAGUA
 - Domicilio: Calle BLVD. ENRIQUE REYNA HERMOSILLO, Ext. 140, Col. SAN JOSÉ DE LOS CERRITOS, C. P. 25294
 - Población, Estado y País: SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

Inventor/Diseñador 5

- Nombre: Ileana VERA REYES
 - CURP: VERI810917MVZRYL02
 - Nacionalidad: MÉXICO
 - Domicilio: Calle BLVD. ENRIQUE REYNA HERMOSILLO, Ext. 140, Col. SAN JOSÉ DE LOS CERRITOS, C. P. 25294
 - Población, Estado y País: SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

Inventor/Diseñador 6

- Nombre: Mario GARCÍA CARRILLO
 - CURP: GACM570118 HCLRRR0
 - Nacionalidad: MÉXICO
 - Domicilio: Calle BLVD. ENRIQUE REYNA HERMOSILLO, Ext. 140, Col. SAN JOSÉ DE LOS CERRITOS, C. P. 25294
 - Población, Estado y País: SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

MÉXICO
GOBIERNO DE LA ESTADOS

SE

COMERCIO
Y ECONOMÍA

IMPI

Contacto:
 Arenal #650, Pueblo Santa María Tepepan,
 Xochimilco, 16020, Ciudad de México.
 Teléfono: (55) 53340700
 www.gob.mx/impi

CONCLUSIÓN GENERAL

Se determino que el tipo de agitacion para producir nHAp influye en la morfología y tamaño de nanopartícula. El rango de tamaños obtenidos para ambos tipos de agitación fue de 10 a 45 nm, con un tamaño predominante de 15 a 20 nm. Con respecto a la morfología, la agitación mecánica produce partículas alargadas similares a bacilos, mientras que la agitación magnética produce partículas mas esféricas. Es posible que el campo magnético del agitador interactue en la formación de las partículas de HAp, haciendo que estas adquieran la forma esférica, sin embargo, en la literatura no existe algún reporte sobre esta interacción, por lo que se recomiendan trabajos en este sentido.

Por otro lado, se muestra evidencia de un efecto nocivo en las semillas de rábano por la aplicación de distintas concentraciones de nHAp. La germinación y el vigor de germinación fueron inhibidos por dosis moderadas de esta nanopartícula, este resultado es contrario a otros trabajos reportados, mostrandose por primera vez un efecto fitotxico de nHAp en semillas. Sin embargo, la plántula de esta especie mostro un efecto promotor de crecimiento.

Los efectos adversos pueden estar relacionado con la morfología de las semillas, entendiéndose que a pesar de que la nHAp contiene P en su composición y este elemento es uno de los principales nutrimentos necesarios para el desarrollo de cultivos, el tamaño nanométrico y la concentración pueden estar afectando a nivel celular los procesos fisiológicos de los mismos.

Se recomienda la realización de estudios más profundos y de campo en diferentes cultivos para evaluar los efectos de las NPs HAp y su interacción con en el suelo y las diferentes partes de las plantas, a fin de identificar los mecanismos de toxicidad, o bien, comprobar una promocion de crecimiento.