

# SÍNTESIS Y EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE FRIJOL

## SYNTHESIS AND EFFECT OF HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES ON THE GERMINATION AND GROWTH OF COMMON BEAN

Nefertiti Laura **de la Vega-García**<sup>1</sup>, Cecilia Beatriz **Peña-Valdivia**<sup>1</sup>, Ma. del Carmen A. **González-Chávez**<sup>2</sup>, Daniel **Padilla-Chacón**<sup>1</sup>, Rogelio **Carrillo-González**<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup>Botánica, <sup>2</sup> Edafología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (crogelio@colpos.mx).

### RESUMEN

Algunos fertilizantes se han diseñado en tamaño nanométrico para mejorar la eficiencia en la absorción de nutrientes, pero previo a su uso generalizado es necesario hacer pruebas de toxicidad. El objetivo de este estudio fue optimizar la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) y evaluar su efecto en la germinación de semillas y crecimiento de plantas frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). La hipótesis fue que las NPHA pueden suplir el P que necesita el frijol sin ser tóxicas. Las NPHA se obtuvieron con el método de precipitación química vía húmeda y la velocidad de adición de reactivos y agitación se variaron. La caracterización incluyó distribución de tamaño de partícula, potencial zeta, estructura cristalina y tamaño de partícula mediante difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier. El efecto de NPHA se evaluó en la germinación y el crecimiento de frijol, en un experimento completamente al azar. Las NPHA fueron altamente cristalinas, con tamaño entre 15.51 a 154.41 nm, con morfología similar a hojas. Las NPHA (250 a 1000  $\mu\text{moles P L}^{-1}$ ) no afectaron la germinación. El crecimiento de la raíz fue similar con las concentraciones entre (250 y 500  $\mu\text{moles P L}^{-1}$ ), pero disminuyó 23.7 y 48% en dosis mayores (750 y 1000  $\mu\text{moles P L}^{-1}$ ). Las NPHA no son tóxicas para frijol (hasta 31  $\text{mg L}^{-1}$  P) y pueden ser útiles para aportar P a las plantas; además, en dosis de 20  $\mu\text{moles L}^{-1}$ , incrementaron la altura de la planta entre 31.3 y 66.7%, respecto a las plantas regadas con solución Hoagland. Sin embargo, es necesario generar más información.

**Palabras clave:** nanofertilizantes, nanotoxicología, fósforo.

### ABSTRACT

Some fertilizers have been designed in nanometric size to improve the efficiency in the absorption of nutrients, but it is necessary to make toxicity tests before their widespread use. This study aimed to optimize the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles (NPHA) and to evaluate its effect on seed germination and growth of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). The hypothesis was that NPHA can supply the P necessary for the bean, without being toxic. NPHA were synthesized by the wet chemical precipitation method, and the speed of addition of reagents and agitation were varied. The characterization included particle size distribution, zeta potential, crystalline structure and particle size by X-ray diffraction, transmission electron microscopy, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The effect of NPHA was evaluated on bean germination and growth, in a completely randomized experiment. The NPHA were highly crystalline, with a size between 15.51 to 154.41 nm, and with similar morphology to leaves. The NPHA (250 to 1000  $\mu\text{mol P L}^{-1}$ ) did not affect the germination. Root growth was similar, with concentrations between 250 and 500  $\mu\text{mol P L}^{-1}$  but decreased 23.7 and 48% in higher doses (750 and 1000  $\mu\text{mol P L}^{-1}$ ). The NPHA are not toxic for beans (up to 31  $\text{mg L}^{-1}$  P) and can be useful to provide P to the plants; moreover in doses of 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  increased the height of the plant between 31.3 and 66.7%, compared to the plants watered with Hoagland solution. However, it is necessary to generate more information.

**Key words:** nanofertilizers, nanotoxicology, phosphorus.

### INTRODUCTION

The use of nanotechnology in biomedicine, pharmacy, food industry, and agriculture increases rapidly, and its impact on the economy, society, and environment is evident.

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2019. Aprobado: febrero, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 1009-1029. 2020.

## INTRODUCCIÓN

El uso de la nanotecnología en biomedicina, farmacia, industria de los alimentos y agricultura aumenta rápidamente y su impacto en la economía, la sociedad y el ambiente es cada vez más relevante. Los nanomateriales (NM) con dimensiones menores de 100 nm se utilizan con mayor frecuencia en productos de alto valor de venta. En la agricultura se ha iniciado su comercialización en fertilizantes (Kin 32, Triple 20-n, Micro-n, Magno-n) y otros insumos. Sin embargo, la evaluación de la toxicidad de las nanopartículas (NP) sintéticas es importante desde el punto de vista de inocuidad, sus efectos en la germinación y el crecimiento de las plantas deben evaluarse previo a promover su uso comercial (Solanki *et al.*, 2015).

La hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), con relación estequiométrica Ca:P 1.67, es uno de los minerales con P que se encuentra principalmente en depósitos biogénicos de huesos (Brzezinska Miecznik., 2015) y en ambientes ígneos y metamórficos. La materia prima para la producción de fertilizantes fosfatados es la roca fosfórica (hidroxiapatita; < 200), cuyas mayores reservas probadas se encuentran en Sudáfrica ( $21 \times 10^9$  millones t), y por la cantidad de reservas México está debajo de la posición 15 (van Kaubewenberbh, 2010). Una fracción considerable del P aplicado a los cultivos queda inmovilizada en el suelo, por lo cual su eficiencia como fertilizante es relativamente baja. Con el aprovechamiento de las propiedades a escala nano (Kale y Gawade, 2016), las nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) podrían aumentar la eficiencia del uso de fertilizantes, al funcionar como fertilizantes de lenta liberación. Hay varios métodos para sintetizar NPHA como la precipitación química húmeda o seca (Zou *et al.*, 2012), la hidrólisis, los procesos hidrotérmicos, solgel, la preparación mecanoquímica y la vía sonoquímica, por lo que seleccionar los eficientes puede ayudar a bajar los costos (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Las rutas de síntesis usando fosfato cálcico y mediante emulsiones-microemulsiones (Zhou y Lee, 2011), también son prácticas.

Los puntos críticos de la producción de NP pueden controlarse efectivamente al variar los parámetros de proceso. La síntesis química vía húmeda es óptima para producir NPHA (Zou *et al.*, 2012) y se basa en reacciones de precipitación de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Nanomaterials (NM), with dimensions less than 100 nm are more frequently used in products with high sales value. In agriculture, their commercialization has begun in fertilizers (Kin 32, Triple 20-n, Micro-n, Magno-n) and other inputs. However, the evaluation of the synthetic nanoparticles (NP) toxicity is important from a safety point of view, its effects on the germination and growth of plants should be evaluated before promoting its commercial use (Solanki *et al.*, 2015).

With Ca:P 1.67 stoichiometric ratio, hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) is one of the P-containing minerals found mainly in biogenic bone deposits (Brzezinska Miecznik., 2015), and in igneous and metamorphic environments. Phosphate rock is the supply for the production of phosphate fertilizers (hydroxyapatite; < 200), whose largest proven reserves are located in South Africa ( $21 \times 10^9$  million t), and given the amount of reserves Mexico is below position 15 (van Kaubewenberbh, 2010). A considerable fraction of the P applied to crops is immobilized in the soil, so its efficiency as a fertilizer is relatively low. Taking advantage of the properties at nano scale (Kale and Gawade, 2016), hydroxyapatite nanoparticles (NPHA) could increase the efficiency of fertilizer use by serving as slow-release fertilizers. There are several methods to synthesize NPHA, such as wet or dry chemical precipitation (Zou *et al.*, 2012), hydrolysis, hydrothermal processes, solgel, mechanochemical preparation, and sonochemical process, therefore, selecting the efficient methods can help lowering costs (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Synthesis routes using calcium phosphate and through emulsion-microemulsions (Zhou and Lee, 2011) are also practical.

The critical points of nanoparticle synthesis can be effectively controlled by varying the process parameters. Wet chemical synthesis is optimal for producing NPHA (Zou *et al.*, 2012), and is based on precipitation reactions of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . In this reaction, the pH is the most important variable to be controlled (Ferraz *et al.*, 2004) to obtain homogeneous particles smaller than 100 nanometers. However, the geometric shape, size, and specific surface of the NPHA depend, to a great extent, on the temperature during the reaction and the speed of addition of the reagents (Engin *et al.*, 2000). Alkaline pH and temperature of 80 °C are necessary to obtain precipitates with low crystallinity

En esta reacción el pH es la variable más importante que debe controlarse (Ferraz *et al.*, 2004) para obtener partículas homogéneas de tamaño menor a los 100 nanómetros. Sin embargo, la forma geométrica, tamaño y superficie específica de las NPHA dependen, en gran medida, de la temperatura durante la reacción y de la velocidad de adición de los reactivos (Engin *et al.*, 2000). El pH alcalino y temperatura de 80 °C son necesarios para obtener precipitados con cristalinidad baja y mayor deficiencia en Ca. Las condiciones experimentales pueden variar según el tipo de apatita que se quiera sintetizar (Eichert *et al.*, 2009).

La germinación de la semilla depende de las condiciones ambientales y de la viabilidad de sus reservas (Koornneef *et al.*, 2002). El desarrollo de la planta depende además del éxito de la germinación, de los nutrientes en el sustrato.

Los efectos de NP, de diversa naturaleza química, se han evaluado en la germinación y desarrollo de las plántulas de especies agrícolas, pero las pruebas se han centrado en los compuestos metálicos por su posible efecto tóxico. Las NP de CuO no afectaron la germinación de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) ni maíz (*Zea mays* L.), pero inhibieron la elongación de la raíz (Stampoulis *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Las NP de ZnO, en dosis de 400 a 800 mg kg<sup>-1</sup>, aumentaron la germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.) y no tuvieron efecto en la biomasa de sus raíces (Zhao *et al.*, 2014). La aplicación NP de TiO<sub>2</sub> a semillas de *Glycine max* L. aceleró la germinación. También incrementó el crecimiento de la planta, al aumentar la absorción y el uso del agua y nutrientes (Lu *et al.*, 2002). Las NP de TiO<sub>2</sub>, en ciertas concentraciones, aumentaron el crecimiento de espinaca (*Spinacia oleácea*) junto con el metabolismo del N y la fotosíntesis (Yang *et al.*, 2007). En contraste con lo anterior, las NP pueden producir efectos tóxicos arriba de ciertas concentraciones (Rico *et al.*, 2011). Aunque el conocimiento sobre la fitotoxicidad de las NP aumenta (Wang *et al.*, 2012), nuestra comprensión sobre estas nanoestructuras y los mecanismos de toxicidad aún no se aclaran por completo para la mayoría de las NP y las especies vegetales. Las NP de CuO en concentraciones mayores de 0.5 mM disminuyeron la germinación de las semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) hasta en 71% (Shaw y Hossain, 2013). Los efectos de las NP en los procesos de germinación de semillas y desarrollo de

and higher Ca deficiency. Experimental conditions may vary according to the type of apatite to be synthesized (Eichert *et al.*, 2009).

Seed germination depends on environmental conditions and the viability of its reserves (Koornneef *et al.*, 2002). The development of the plant also depends on the success of germination and the nutrients in the substrate.

The effects of NPs, of diverse chemical nature, have been evaluated in the germination and seedling development of agricultural species, but the tests have focused on the metallic compounds due to their possible toxic effect. Nanoparticles of CuO did not affect the germination of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.) nor corn (*Zea mays* L.), but inhibited root elongation (Stampoulis *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Nanoparticles of ZnO, at doses of 400 to 800 mg kg<sup>-1</sup>, increased the germination of cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) and did not affect the root biomass (Zhao *et al.*, 2014). The application of NPs of TiO<sub>2</sub> to *Glycine max* L. seeds speed up the germination. It also increased plant growth by augmenting absorption and the use of water and nutrients (Lu *et al.*, 2002). Nanoparticles of TiO<sub>2</sub> exposition increased spinach (*Spinacia oleácea*) growth along with N metabolism and photosynthesis (Yang *et al.*, 2007). In contrast, NPs can produce toxic effects above certain concentrations (Rico *et al.*, 2011). Although knowledge on the phytotoxicity of NPs is increasing (Wang *et al.*, 2012), the understanding of these nanostructures and the mechanisms of toxicity is not yet fully understood for most NPs and plant species. NPs of CuO in concentrations higher than 0.5 mM decreased the germination of rice seeds (*Oryza sativa* L.) by up to 71% (Shaw and Hossain, 2013). The effects of NPs on the processes of seed germination and seedling development are determined by the NP characteristics (chemical composition, size, surface area, reactivity, and concentration), and by the plant species (Solanki *et al.*, 2015).

The toxicity of non-metallic NPs that may be a source of nutrients has not been evaluated in plant beans. Toxicity studies in plants may be long-term (greater than eight weeks), to evaluate effects on biomass production and root length, and to measure chronic and acute toxicity. Short-term studies addressed changes in germination; these experiments are sensitive, simple, and reproducible at low cost (Wang *et al.*, 2001).

la plántula se determinan por las características de las NP (composición química, tamaño, área superficial, reactividad y concentración) y por la especie vegetal (Solanki *et al.*, 2015).

La toxicidad de NP no metálicas que pueden ser fuente de nutrientes no se ha evaluado en frijol. Los estudios de toxicidad en plantas pueden ser a largo plazo (mayores de ocho semanas), para evaluar los efectos en la producción de biomasa y longitud de raíz, y medir la toxicidad crónica y aguda. Los estudios de corto plazo incluyen los cambios en la germinación, estos tienen sensibilidad, simplicidad y reproducibilidad altas y bajo costo (Wang *et al.*, 2001).

Los objetivos del presente estudio fueron obtener NPHA mediante la adaptación de la metodología de la síntesis por precipitación química propuesta por Ortiz *et al.* (2017) y evaluar su efecto en la germinación de semillas y el crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). La hipótesis fue que las nanopartículas de hidroxiapatita aportan suficiente fósforo para el crecimiento de frijol sin ser tóxica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Síntesis química de NPHA

La síntesis de NPHA se basó en el método de síntesis húmeda, descrito por Ortiz *et al.* (2017) y al cual se hicieron modificaciones. La síntesis resulta de la reacción de precipitación en sistema abierto (Kumar *et al.*, 2004) entre  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  0.1 M (100 mL) y el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.06 M (100 mL, grado reactivo, Meyer). El  $\text{H}_3\text{PO}_4$  se adicionó lentamente (velocidad de flujo de  $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), con una bomba peristáltica a la solución de hidróxido de calcio. La mezcla se mantuvo a  $76 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  máximo. El pH se midió con potenciómetro (Orion Research 701 A) y se ajustó a 11, añadiendo una solución de KOH 1.0 M, para inducir la formación de la hidroxiapatita. La reacción finalizó al consumirse el ácido. Entonces se suspendió el calentamiento y la agitación continuó por 30 min. Para asegurar la cristalización de las NPHA se aplicó ultrasonido (Branson modelo 1510) por 15 min, y se mantuvieron en botella de polietileno a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su caracterización.

### Determinación de la eficiencia de síntesis y caracterización de NPHA

La eficiencia en la síntesis de NPHA se determinó con la cuantificación de P y Ca en el sobrenadante, las interferencias por ionización se inhibieron con la adición de cloruro de lantano ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) en medio ácido, después de centrifugar a  $8000 \text{ g}$

The objectives of this study were to obtain NPHA by adapting the chemical precipitation synthesis methodology proposed by Ortiz *et al.* (2017) and to evaluate its effect on seed germination and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth. The hypothesis was that hydroxyapatite nanoparticles provide enough phosphorus for bean growth without being toxic.

## MATERIALS AND METHODS

### NPHA chemical synthesis

The synthesis of NPHA was based on the wet synthesis method, described by Ortiz *et al.* (2017), and to which modifications were made. The synthesis results from the open system precipitation reaction (Kumar *et al.*, 2004) between 0.1 M  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (100 mL) and 0.06 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (100 mL, reactive grade, Meyer). Orthophosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) was added slowly ( $1.5 \text{ mL min}^{-1}$  flow rate) to the calcium hydroxide solution with a peristaltic pump. The mixture was kept at  $76 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  max. The pH was measured with a potentiometer (Orion Research 701 A), buffered to 11, adding a 1.0 M KOH solution, to induce the formation of hydroxyapatite. The reaction ended when the acid was consumed. Heating was then suspended, and agitation continued for 30 min. To ensure crystallization of the NPHA, the solution was sonicated (Branson, model 1510) for 15 min, and NPHA were kept in polyethylene bottles at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  until the characterization.

### The efficiency of NPHA synthesis and characterization of NP

The efficiency in the NPHA synthesis was determined through the quantification of P and Ca in the supernatant. The interferences by ionization were inhibited with the addition of lanthanum chloride ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) in acid medium, after centrifugation at  $8000 \text{ g}$  for 10 min. Ca was determined by atomic absorption in a spectrophotometer (Perkin Elmer 3110), at  $422.7 \text{ nm}$ . P was measured by the method proposed by Murphey and Riley (1962), in which the complex formed from the reaction of P with Mo and Sb is quantified by colorimetry at  $880 \text{ nm}$  (UV-visible spectrophotometer; Varian Cary 50). For this process a calibration curve was used (prepared with Purity certified standards), with P between 0 and  $1.2 \text{ mg L}^{-1}$ .

### Determination of size distribution, Z-potential, and polydispersity index

The NPHA size distribution was determined by Dynamic Light Scattering (DLS), in which the He-Ne laser measures

por 10 min. El Ca se determinó por absorción atómica en un espectrofotómetro (Perkin Elmer 3110), a 422.7 nm. El P se midió por el método propuesto por Murphey y Riley (1962), en el cual el complejo formado de la reacción de P con Mo y Sb se cuantifica por colorimetría a 880 nm (espectrofotómetro UV-visible; Varian Cary 50). Para esto se usó una curva de calibración (preparado con estándares certificados Purity), con P entre 0 y 1.2 mg L<sup>-1</sup>.

#### **Determinación de la distribución de tamaño, potencial Z e índice de polidispersidad**

La distribución del tamaño de NPHA se determinó por dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering DLS), en la cual el láser de He-Ne mide el movimiento browniano de las partículas y lo relaciona con su tamaño nanométrico.

El potencial Zeta (pZ) es la medida de la magnitud de la electrostática (cargas en equilibrio) entre las partículas en un coloide y proporciona información sobre la dispersión, agregación o floculación del material en estudio. La evaluación es mediante dispersión de luz por electroforesis Doppler y un pZ de gran magnitud se correlaciona con mayor estabilidad coloidal. El índice de polidispersidad (PdI) se refiere a los tamaños de las NP en suspensión (valor 0 y 1). Si las partículas en la muestra son homogéneas, el valor PdI se aproximará a cero (Malvern Panalytical, 2018). La medición de los tres parámetros se realizó con el equipo Zetasizer Nano (ZS, Malvern Instruments Limited, UK). Para realizar estas mediciones las muestras se sonicaron por 10 min antes de la evaluación.

#### **Identificación de los grupos químicos funcionales**

Las NPHA se caracterizaron con espectroscopia infrarroja, con transformada de Fourier (FTIR). La frecuencia de vibración, características de la hidroxiapatita, se obtuvo en el intervalo de 4000 a 300 cm<sup>-1</sup> en el equipo Agilent Technologies Cary 630 FTIR.

#### **Determinación de la pureza de NPHA sintetizadas**

La pureza se determinó por difracción de rayos X en un difractómetro (GBC Spellman DF3) con tubo de rayos X, radiación de Cu K<sub>α</sub> (λ = 1.54 Å) y foco lineal (40 kV y 15 mA) (Jenkins y Snyder, 1996). En el haz incidente se utilizó una rendija Soller (0.5 mm) con filtro de níquel. Los patrones de difracción de alta calidad se obtuvieron en tiempo mínimo con un detector ultra de alta velocidad. Las mediciones se hicieron en geometría simétrica o de polvos (θ - 2θ), con el barrido de 3.5 a 60°, tamaño de paso de 0.01 y velocidad de 3° min<sup>-1</sup>.

the Brownian motion of the particles and relates it to their nanometric size.

The Zeta potential (pZ) is the measurement of the electrostatics magnitude (charges at equilibrium) between particles on a colloid and provides information on the dispersion, aggregation, or flocculation of the material under study. The evaluation is made through light scattering by Doppler electrophoresis, and a high magnitude pZ correlates with higher colloidal stability. The polydispersity index (PdI) refers to the sizes of NPs in suspension (0 and 1 value). If the particles in the sample are homogeneous, the PdI value will approach zero (Malvern Panalytical, 2018). The measurement of the three parameters was performed with Zetasizer Nano (ZS, Malvern Instruments Limited, UK) equipment. To perform these measurements, samples were sonicated for 10 min before the assessment.

#### **Identification of functional chemical groups**

NPHA were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The vibration frequency, which is characteristic of hydroxyapatite, was obtained in the range of 4000 to 300 cm<sup>-1</sup> in the Agilent Technologies Cary 630 FTIR equipment.

#### **Determination of purity of synthesized NPHA**

The purity was determined by X-ray diffraction in a diffractometer (GBC Spellman DF3) with X-ray tube, Cu K<sub>α</sub> radiation (λ = 1.54 Å), and line focus (40 kV and 15 mA) (Jenkins and Snyder, 1996). A Soller slit (0.5 mm) with a nickel filter was used in the incident beam. High-quality diffraction patterns were obtained in minimal time with an ultra-high-speed detector. The measurements were made in symmetric or powder geometry (θ - 2θ), with scanning of 3.5 to 60°, step size of 0.01 and speed of 3° min<sup>-1</sup>.

#### **Determination of particle morphology and size**

The NPHA morphology and size were determined in a transmission electron microscope (JEOL JEM-1011; JEOL Ltd. Tokyo, Japan), in samples covered by an amorphous C film. In these samples, the average diameter was determined by dynamic light scattering (DLS). The micrographs were obtained at 12 000 magnification.

#### **Concentration of P available in NPHA**

The release of available P was quantified by extraction as soluble P at 2% citric acid (Ordoñez and Castellanos, 1996).

### Determinación de la morfología y tamaño de partículas

La morfología y tamaño de las NPHA se determinaron en microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1011; JEOL Ltd. Tokyo, Japan), en muestras recubiertas por una película de C amorfo. En éstas se determinó el diámetro promedio por dispersión de la luz dinámica (DLS). Las micrografías se obtuvieron con 12 000 aumentos.

### Concentración de P disponible en NPHA

La liberación de P disponible se cuantificó por extracción como P soluble en ácido cítrico a 2% (Ordoñez y Castellanos, 1996). A 50 mL de NPHA, en suspensión, se adicionó 20 mL de solución de ácido cítrico, se agitó por 2 h, se aforó a 100 mL con agua destilada y el P se cuantificó por espectrometría (Murphy y Riley, 1962).

### Cinética de solubilidad del P en NPHA en la solución Hoagland

La cinética de solubilidad de P en las NPHA se comparó con la de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (testigo) en solución Hoagland, con 20  $\mu\text{M}$  de P (Millner y Kitt, 1992) por 90 min. La concentración de P se ajustó a la de la solución nutritiva completa. El P soluble se cuantificó con el método descrito por Murphy y Riley (1962).

### Evaluación del efecto de NPHA en la germinación y crecimiento de frijol

#### Determinación de la germinación de las semillas

La toxicidad de las NPHA se evaluó en semillas de frijol variedad G-15. Las semillas no mostraban daños físicos aparentes, el color amarillo de su testa y tamaño fueron homogéneos a la vista. La superficie de 50 semillas se desinfectó mediante lavados con agua destilada, inmersión por 1 min en solución acuosa de hipoclorito de sodio comercial (5% v: v) y lavados con agua destilada. Los tratamientos se establecieron en las semillas (concentraciones equivalentes a 250, 500, 750, 1000  $\mu\text{moles}$  de  $\text{P L}^{-1}$  en NPHA, y un testigo sin NPHA). Las semillas se mantuvieron 1 h en frascos con 250 mL de agua o el equivalente al volumen de imbibición (Billard *et al.*, 2014) de suspensiones de NPHA a cada concentración de P. Después se colocaron en cajas Petri, con algodón y papel filtro humedecidos con agua destilada y se mantuvieron a 28 °C, en obscuridad (Ferguson, 1993). La germinación se consideró positiva cuando la radícula emergió 2 mm.

20 mL de citric acid solution were added to 50 mL of NPHA in suspension, stirred for 2 h, measured at 100 mL with distilled water, and the P was quantified by spectrometry (Murphy and Riley, 1962).

#### P Solubility kinetics in NPHA in the Hoagland solution

The P solubility kinetics in NPHA was compared with that of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (control) in Hoagland solution, with 20  $\mu\text{M}$  of P (Millner and Kitt, 1992) for 90 min. The P concentration was adjusted to that of the complete nutrient solution. Soluble P was quantified by the method described by Murphy and Riley (1962).

### Evaluation of the NPHA effect on bean germination and growth

#### Determination of seed germination

The NPHA toxicity was evaluated in bean seeds of the G-15 variety. The seeds showed no apparent physical damage, the yellow color of their heads and size were homogeneous at sight. The surface of 50 seeds was disinfected by washing it with distilled water, immersed for 1 min in an aqueous solution of commercial sodium hypochlorite (5% v: v), and washed again with distilled water. The treatments were established in the seeds (concentrations equivalent to 250, 500, 750, 1000  $\mu\text{mol}$  of  $\text{P L}^{-1}$  in NPHA, and control without NPHA). Seeds were kept for 1 h in flasks with 250 mL of water or the equivalent to the imbibition volume (Billard *et al.*, 2014) of NPHA suspensions at each P concentration. Then, the seeds were placed in Petri dishes, with cotton and filter paper moistened with distilled water, and kept in darkness at 28 °C (Ferguson, 1993). The germination was considered positive when the radicle emerged 2 mm.

#### Determination of P in cotyledons and embryonic axis

The embryonic axis and cotyledons were separated from the seeds after 7 d of growth, weighed on the analytical balance, immersed in liquid nitrogen, and freeze-dried. The weight of the dehydrated tissues was recorded. The tissues were ground in a mortar, the mineralization of the tissues was done by wet digestion, and the P content was determined with the method of Murphy and Riley (1962).

#### Evaluation of the radicle length of the seedlings

The length of the radicle (cm) and the diameter below the neck were measured on the third day of germination. The

### Determinación de P en cotiledones y eje embrionario

El eje embrionario y los cotiledones se separaron de las semillas después de 7 d de crecimiento, se pesaron en la balanza analítica, se sumergieron en nitrógeno líquido y se liofilizaron. El peso de los tejidos deshidratados se registró. Los tejidos se trituraron en un mortero, se hizo la mineralización de los tejidos por digestión húmeda y el contenido de P se determinó con el método de Murphy y Riley (1962).

### Evaluación de la longitud de la radícula de las plántulas

La longitud de la radícula (cm) y el diámetro abajo del cuello se midieron al tercer día de la germinación. Las radículas se escanearon (escáner Hp officejet 6110, con resolución de 600 puntos por pulgada) y se midió con el editor gráfico Image J Windows 32 (GIMP 2).

### Efecto en el crecimiento de la planta de frijol

Las plantas se cultivaron en invernadero (19° 30' N, 98° 51' O y altitud de 2250 m) entre el 20 de abril (siembra) y 3 de junio de 2018 (cosecha); la temperatura fue 28 a 41 °C, con 12-13 h de fotoperiodo; en un sistema hidropónico. Las semillas se sembraron en macetas de plástico de 4 kg de capacidad, con piedra roja volcánica (tezontle) y con partículas de diámetro  $\leq 5$  mm. Este sustrato se humedeció con agua potable a capacidad de campo. Las plantas se regaron cada 3 d con solución nutritiva Hoagland. La concentración común de P usado en la solución Hoagland es 40  $\mu\text{M}$ , pero en la presente investigación se preparó a 20  $\mu\text{M}$ , simulando un suelo bajo en fósforo. Catorce días después de la siembra las plantas se separaron en dos grupos; uno se mantuvo como testigo (regadas con solución Hoagland baja en P; Millner y Kitt, 1992), y otro con 50 mL de NPHA suspendidas en la solución nutritiva Hoagland, equivalente a 20  $\mu\text{moles}$  de P L<sup>-1</sup>. La altura de las plantas se midió durante su desarrollo, se contabilizaron las inflorescencias el primer día de anthesis y se determinó la biomasa y longitud de las vainas en la cosecha.

### Diseño experimental y análisis de resultados

El modelo experimental fue completamente al azar con número variable de repeticiones entre las determinaciones: ocho para la síntesis y caracterización de las NPHA, cinco para la germinación de las semillas (con diez semillas por repetición) y crecimiento de la raíz de las plántulas y cinco para evaluar el crecimiento de la planta, con una planta como unidad experimental. Los resultados se analizaron con el programa estadístico R x 64 3.4.3, mediante análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba

radicles were scanned (Hp Officejet 6110 scanner, 600 dots per inch resolution) and measured with the Image J Windows 32 (GIMP 2) graphics editor.

### Effect on bean plant growth

The plants were grown in a greenhouse (19° 30' N, 98° 51' W and 2250 m altitude) between April 20 (planting) and June 3, 2018 (harvest); the temperature was 28 to 41 °C, with 12-13 h of photoperiod in a hydroponic system. Seeds were sown in 4 kg plastic pots, with volcanic red stone (tezontle) and with particles of  $\leq 5$  mm in diameter. This substrate was moistened with drinking water at field capacity. The plants were watered every 3 d with Hoagland nutrient solution. The common concentration of P used in the Hoagland solution is 40  $\mu\text{M}$ , but in this research it was prepared at 20  $\mu\text{M}$ , simulating a low phosphorous soil. Fourteen days after sowing, plants were separated into two groups; one was kept as control (irrigated with low P Hoagland solution; Millner and Kitt, 1992), and the other with 50 mL of NPHA suspended in the Hoagland nutrient solution, equivalent to 20  $\mu\text{mol}$  of P L<sup>-1</sup>. The height of the plants was measured during their development, the inflorescences were counted on the first day of anthesis, and the biomass and length of the pods were determined at harvest.

### Experimental design and analysis of results

The experimental model was completely randomized with a variable number of replicates between determinations: eight for the synthesis and characterization of the NPHA, five for seed germination (with ten seeds per replicate) and root growth of the seedlings, and five to evaluate plant growth, with one plant as the experimental unit. The results were analyzed with the R x 64 3.4.3 statistical program, through analysis of variance (ANOVA) and Tukey's mean comparison test ( $p \leq 0.05$ ), after verifying the normality assumptions.

## RESULTS AND DISCUSSION

### NPHA chemical synthesis

Before the procedure optimization, NPHA were variable in size, from 85 to 8902 nm, with an average of 99 nm. The adjustment of the procedure (Table 1) allowed to standardize the particle size to less than 100 nm. The reproducibility of the method modification was checked when evaluating eight successive syntheses: 10% with 5 nm size, 48% of 45 nm, and 30% of 154 nm (Figure 1). One of the advantages

comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), previa verificación de los supuestos de normalidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis química de NPHA

Previo a la optimización del procedimiento, las NPHA tenían tamaño variable, de 85 a 8902 nm, con promedio de 99 nm. El ajuste del procedimiento (Cuadro 1) permitió estandarizar el tamaño de partícula, menor a 100 nm. La reproducibilidad de la modificación del método se comprobó al evaluar ocho síntesis sucesivas; 10% con tamaño de 5 nm, 48% de 45 nm y 30% de 154 nm (Figura 1). Una ventaja del método es el control de la morfología y el tamaño de partícula (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Por lo tanto, éste fue uno de los métodos más utilizados (60%) en las investigaciones publicadas entre 1999 y 2011 (Sadat-Shojai *et al.*, 2013); aunque las desventajas

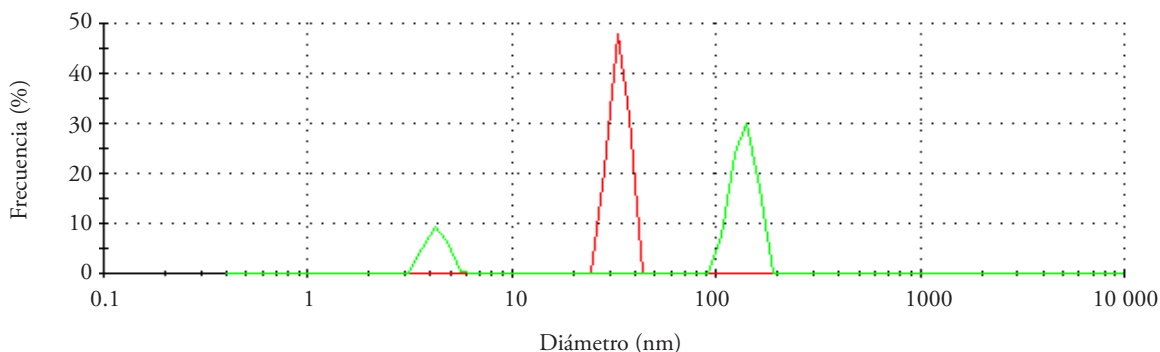
of the method lies in the control of morphology and particle size (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Therefore, this was one of the most used methods (60%) in the investigations published between 1999 and 2011 (Sadat-Shojai *et al.*, 2013); although, the disadvantages of the procedure are the difficulty to control the crystallinity, purity, and limitations for production of large quantities of NPHA.

The temperature control, speed of addition of reagents, and pH are fundamental in the synthesis of NPs (García *et al.*, 2006). The reaction temperature determines whether the crystals will be monocrystalline or polycrystalline. At a temperature lower than 60 °C, monocrystalline crystals are obtained, and polycrystalline at higher than 60 °C (Ferraz *et al.*, 2004), which means that many nuclei are formed where small crystals grow, with a different orientation, usually randomly, and with some irregularities in the atomic arrangement. This polycrystallinity increases the specific surface. In this

**Cuadro 1. Modificación del método de síntesis química, vía húmeda, de nanopartículas de hidroxiapatita descrito por Ortiz *et al.* (2017).**

**Table 1. Modification of the wet chemical synthesis method of hydroxyapatite nanoparticles described by Ortiz *et al.* (2017).**

Variables	Ortiz <i>et al.</i> (2017)	En el presente estudio
Temperatura de inicial	50 °C	74 - 76 °C
Velocidad de adición de reactivos	3 mL min <sup>-1</sup>	1.5 mL min <sup>-1</sup>
Velocidad de agitación	400 rpm	300 rpm
pH final	10	11
Tiempo de agitación	1.5 h	1.0 h
Tiempo de sonicación	30 min	15 min
Tamaño de partícula	85 - 8092 nm	46.37 - 154.41 nm
Tiempo total de reacción	8 h	4 h



**Figura 1. Frecuencia de distribución de diámetro de partículas con índice de polidispersidad de uno, en la síntesis optimizada.**  
**Figure 1. Frequency of diameter distribution of particles with a polydispersity index of one, in the optimized synthesis.**

del procedimiento son la dificultad para controlar la cristalinidad, la pureza y las limitaciones para producción de cantidades grandes de NPHA.

El control de temperatura, velocidad de adición de reactivos y pH son fundamentales en la síntesis de NP (García *et al.*, 2006). La temperatura de reacción determina si los cristales serán monocristalinos o policristalinos. A menos de 60 °C se obtienen los primeros y a más de 60 °C los policristalinos (Ferraz *et al.*, 2004), es decir se forman muchos núcleos donde crecen los cristales pequeños con diferente orientación, usualmente al azar, con algunas irregularidades en la disposición atómica. Esta poli-cristalinidad aumenta la superficie específica. En el presente estudio (Cuadro 1), con la temperatura de reacción mayor a 60 °C, se obtuvieron policristales de HAP. Rivera *et al.* (2010) observaron que la variación del pH durante la precipitación de las NP no afectó la pureza, pero la cristalinidad y la morfología sí se alteraron y el pH alcalino es necesario para la formación de NPHA (García *et al.*, 2006). En el presente estudio, el pH de la reacción se mantuvo en 11, para evitar la formación de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  - amorfo. La velocidad de adición de los reactivos ( $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ ) y la temperatura inicial (mayor a 50 °C) favorecieron la nucleación de la NPHA. El flujo rápido de reactivos beneficia la formación de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  amorfo (Liu *et al.*, 2001); así, la disminución de la velocidad de adición de reactivo, a la mitad de la propuesta por Ortiz *et al.* (2017), incrementó el tiempo de reacción y el rendimiento. Lo que permitió mejor control en el crecimiento de los cristales, pues al dispersarse mejor se evita la aglomeración.

### Eficiencia de la síntesis

La eficiencia de la síntesis se determinó con el contenido de P y Ca en la solución de la síntesis. En el sobrenadante no se detectó P soluble, lo cual implica que éste se consumió por completo en la formación de hidroxiapatita, mientras que la concentración de Ca osciló entre 251.9 y 266.8  $\text{mg L}^{-1}$ . La síntesis química permite formar  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , por el cambio acelerado del pH, esto puede disminuir la concentración del  $\text{PO}_4^{3-}$ , como especie predominante, y a su vez ser insuficiente para mantener la estequiometría ( $\text{Ca/P} = 1.67$ ) y formar NPHA (Sequeda *et al.*, 2012). Además, debido a que el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  es un ácido triprótico débil, no se disocia completamente, favorece la obtención de NPHA deficiente en Ca (Pretto *et al.*

study (Table 1), NPHA polycrystals were obtained with a reaction temperature higher than 60 °C. Rivera *et al.* (2010) observed that pH variation during NP precipitation did not affect purity, but crystallinity and morphology were altered; alkaline pH is necessary for NPHA formation (García *et al.*, 2006). In this study, the reaction pH was kept at 11, to avoid the formation of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  - amorphous. The speed of addition of the reagents ( $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ ) and the initial temperature (higher than 50 °C) favored the NPHA nucleation. The rapid flow of reagents benefits the formation of amorphous  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Liu *et al.*, 2001); thus, the decrease in reagent addition rate in half of that proposed by Ortiz *et al.* (2017), increased the reaction time and yield. This allowed a better control in the growth of the crystals since better dispersion avoids agglomeration.

### Synthesis efficiency

The efficiency of the synthesis was determined by the content of P and Ca in the synthesis solution. Soluble P was not detected in the supernatant, which implies that it was completely consumed in the formation of hydroxyapatite, while the concentration of Ca varied between 251.9 and 266.8  $\text{mg L}^{-1}$ . The chemical synthesis allows the formation of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , due to the accelerated change of the pH, this can decrease the concentration of  $\text{PO}_4^{3-}$  as predominant species, and at the same time be insufficient to maintain the stoichiometry ( $\text{Ca/P} = 1.67$ ) and form NPHA (Sequeda *et al.*, 2012). Besides, since  $\text{H}_3\text{PO}_4$  is a weak triprotic acid, it does not dissociate completely, favoring attainment of NPHA deficient in Ca (Pretto *et al.*, 2003). This suggests that the efficiency of synthesis and the amount of formed NPHA increases at lower P and higher Ca concentration in the supernatant. In contrast, one of the main disadvantages of the method is the formation of Ca and P salts, different from NPHA (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Therefore, the control of factors such as temperature, speed of reagent addition, and pH is necessary to increase the efficiency of the synthesis; furthermore, to maintain the stoichiometric molar Ca/P ratio in the NPHA (Ledema-Carrión, 2016). The synthesis efficiency of NPHA in this study was 99.3%.

*et al.*, 2003). Esto sugiere que, a concentración menor de P y mayor de Ca en el sobrenadante, aumenta la eficiencia de la síntesis y la cantidad de NPHA que se forma. En contraste, una de las principales desventajas del método es la formación de sales de Ca y P, distintas a NPHA (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Por lo tanto, el control de factores como temperatura, velocidad de adición de reactivo y pH es necesario para incrementar la eficiencia de la síntesis; además, mantener la relación molar estequiométrica Ca/P en las NPHA (Ledezma-Carrión, 2016). La eficiencia de síntesis de NPHA en el presente estudio fue 99.3%.

### Caracterización de NPHA

La caracterización de las partículas sintéticas, como frecuencia de los intervalos de tamaño, morfología, potencial Z, pureza, grupos químicos y concentración de P disponible, demuestra que se obtuvo el tamaño y composición del compuesto objeto de estudio.

### Distribución de tamaño y potencial Z

La determinación de la distribución del tamaño de partícula requiere el índice de absorción de las NPHA. Una de estas bandas de absorción máxima es 232 nm, que corresponde a las NPHA del presente estudio. Además, su índice de refracción a 25 °C fue 1.33 nm, similar al del agua (Serway y Jewett, 2004), que fue el medio dispersante de las NP.

La DLS en la mezcla de NPHA de varias síntesis indicaron que el tamaño medio de partícula de las NPHA siguió una distribución monomodal (Stefanic *et al.*, 2017). La distribución del tamaño de partícula no fue homogénea, lo que pudo deberse a la policristalinidad inducida por la agitación y la temperatura. Los registros de frecuencia directa de muestras de NPHA concentradas (a 100%) reflejaron que el tamaño de partícula estuvo centrado en 6.654 nm. Las mezclas diluidas a 50% y a 25% mostraron abundancia de NP de diámetro de 14.47, 28.25, 33.37 y algunas de 132.4 nm, lo que mostró heterogeneidad en los diámetros. El PDI fue 1.000 en todas las muestras y este valor es indicativo de uniformidad (Stefanic *et al.*, 2017); por tanto, la muestra fue poli-dispersa en la suspensión (Figura 1).

### NPHA characterization

The characterization of the synthetic particles, such as frequency of size intervals, morphology, Z potential, purity, chemical groups, and available P concentration, shows that the size and composition of the compound under study was obtained.

### Size distribution and Z potential

The determination of particle size distribution requires the absorption rate of NPHA. One of these maximum absorption bands is 232 nm, which corresponds to the NPHA of this study. In addition, their refractive index at 25 °C was 1.33 nm, like that of water (Serway and Jewett, 2004), which was the means of dispersion for NPs.

The DLS in the NPHA mixture from various syntheses indicated that the mean particle size of the NPHA followed a monomodal distribution (Stefanic *et al.*, 2017). The particle size distribution was not homogeneous, which could be due to the polycrystallinity induced by agitation and temperature. Direct frequency records of concentrated NPHA samples (at 100%) reflected that the particle size was centered at 6.654 nm. The mixtures diluted at 50% and 25% showed an abundance of NPs with diameters of 14.47, 28.25, 33.37, and some of 132.4 nm, which showed heterogeneity. The PDI was 1.000 in all samples, whose value is indicative of uniformity (Stefanic *et al.*, 2017); therefore, the sample was poly-dispersed in the suspension (Figure 1).

### Zeta potential

The pZ made it possible to determine the electrical charges on the surface of the NPHA. Particles with  $pZ \geq 30$  mV or  $\leq -30$  mV are stable (Zetasizer Nano series, 2004). The NPHA mixtures at 100%, 50%, and 25% of this study presented pZ of -35.0, -35.3 and -33.5 mV, respectively (Figure 2). In other samples at 100%, it was -34.6 mV and -35.1 mV, and they were stable in aqueous medium. Therefore, the NPHA of this study were qualified as stable; they behave like the negatively charged colloids of the soil, so no negative effect on plants is expected.

## Potencial Zeta

El pZ permitió determinar las cargas eléctricas en la superficie de las NPHA. Las partículas con pZ  $\geq 30$  mV o  $\leq -30$  mV son estables (Zetasizer Nano series, 2004). Las mezclas de NPHA a 100%, 50% y 25% del presente estudio presentaron pZ de -35.0, -35.3 y -33.5 mV, respectivamente (Figura 2). En otras muestras a 100% fue -34.6 mV y -35.1 mV, y fueron estables en medio acuoso. Por lo tanto, las NPHA de este estudio se calificaron como estables; se comportan como los coloides con carga negativa del suelo, por lo que no se espera efecto negativo en las plantas.

La dispersión y distribución de las NPHA depende del tamaño de partícula, pero es conveniente usar un agente dispersante que les confiera estabilidad. En el presente estudio las NPHA se mantuvieron suspendidas en la solución por algunos días, pero eventualmente se sedimentaron y formaron un lecho. Stefanic *et al.* (2017) y Pleixats y Shafir (2017) mostraron que las NPHA forman suspensiones coloidales estables con polietilenglicol y otros polímeros, dendrímeros, b-ciclodextrinas, tensoactivos iónicos y no iónicos y ligandos orgánicos de distinta polaridad. El pZ depende también de la naturaleza del dispersante.

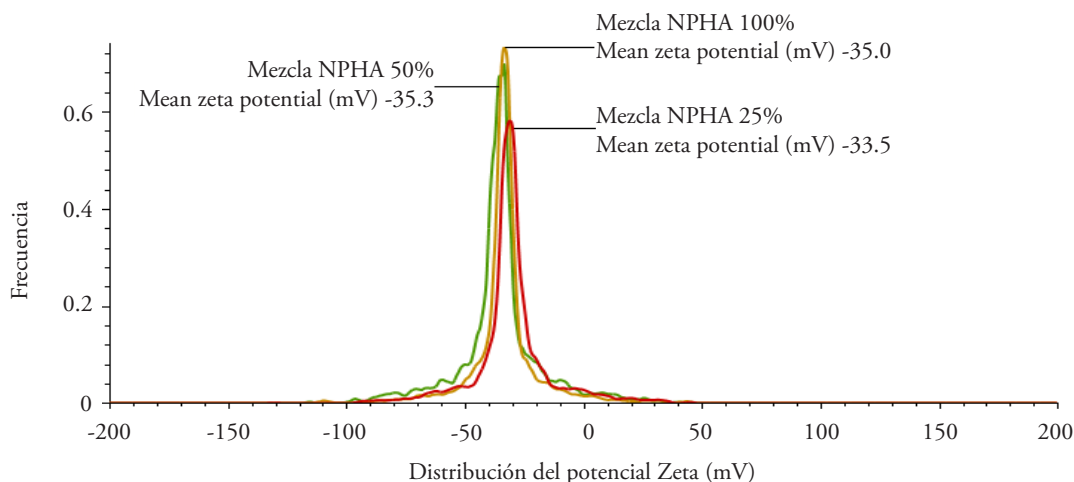
El pH influye en el pZ de las NP; el incremento del pH disminuye el valor del pZ (Cameiro-da-Cunha *et al.*, 2011), lo que permite que predomine la carga negativa y dispersas las partículas (Degen y Kosec, 2000). En el presente estudio, el pH 11 favoreció la estabilidad, ya que mantuvo su carga negativa. Los

The dispersion and distribution of NPHA depend on the particle size, but it is convenient to use a dispersing agent that increases stability. In this study, the NPHA were suspended in the solution for a few days, but eventually, they sedimented and formed a deposit. Stefanic *et al.* (2017) and Pleixats and Shafir (2017) showed that NPHA forms stable colloidal suspensions with polyethylene glycol and other polymers, dendrimers, b cyclodextrins, ionic and non-ionic surfactants, and organic ligands of different polarity. The pZ also depends on the nature of the dispersant.

The pH influences the pZ of NPs; increasing the pH decreases the pZ value (Cameiro-da-Cunha *et al.*, 2011), allowing negative charge to predominate and particles to be dispersed (Degen and Kosec, 2000). In this study, a pH of 11 favored stability since alkalinity maintained its negative charge. Nanoparticles are less stable at pH between 4 and 7.5 because NPs tend to neutralize charges and form aggregates (Zetasizer Nano series, 2004). Similarly, a pH of 11 during the reaction favored the polydispersity of the formed NPHA.

## Particle size and morphology

The size ranged between 15.51 and 87.17 nm, and the nanostructure (leaf shape) of the NPHA was observed (Figure 3) by microscopy. Sadat-Shojai *et al.* (2013) described diverse forms of NPHA depending on their obtaining method. The sizes and shapes of the NPHA in this study matched those obtained



**Figura 2. Distribución del potencial zeta de la mezcla de nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA).**  
**Figure 2. Zeta potential distribution of the mixture of hydroxyapatite nanoparticles (NPHA).**

sistemas son menos estables en pH entre 4 y 7.5, porque las NP tienden a neutralizar las cargas y formar agregados (Zetasizer Nano series, 2004). De igual manera, un pH de 11 durante la reacción favoreció la polidispersidad de las NPHA formadas.

### Morfología y tamaño de partícula

Por microscopía se observó el tamaño entre 15.51 y 87.17 nm y la nanoestructura (forma de hoja) de las NPHA (Figura 3). Sadat-Shojai *et al.* (2013) describieron formas diversas de NPHA en función del método de obtención. Los tamaños y forma de las NP del presente estudio coincidieron con las obtenidas con un método convencional de precipitación química (Sadat-Shojai *et al.*, 2013), pero fueron mayores ( $3.5 \pm 10$  nm) a lo reportado por Suvorova y Buffat, (1999).

### Pureza de las NP

Los difractogramas de rayos X de la mezcla de NPHA mostraron tres picos máximos estrechos; entre ellos se identificó el correspondiente a NPHA, con la intensidad mayor a  $2\theta = 32$ , en los picos de difracción que corresponden a los planos 211 y dos menos intensos en  $2\theta = 25.5$  y  $2\theta = 49$  en los planos 002 y 213. Además, otro pico con intensidad menor prueba la formación de otro fosfato de calcio. El pH es fundamental en la formación de NPHA cristalina

with a chemical precipitation conventional method (Sadat-Shojai *et al.*, 2013), but they were larger ( $3.5 \pm 10$  nm) than those reported by Suvorova and Buffat, (1999).

### NP purity

X-ray diffractograms of the NPHA mixture showed three narrow maximum peaks; among them, the one corresponding to NPHA was identified, with the highest intensity at  $2\theta = 32$  and diffractions peaks corresponding to the planes 211, and two less intense ones at  $2\theta = 25.5$  and  $2\theta = 49$  in planes 002, and 213. The pH is fundamental in the formation of crystalline NPHA (basic pH), and the order of addition of the reagents during the formation of the crystals and the aging period are the most relevant factors in the formation of NPHA crystals (García *et al.*, 2006). In this regard, the maximums of the X-ray diffraction pattern in this study matched the results in hydroxyapatite nanometric powder reported by Rivera *et al.* (2010).

### Functional chemical groups

The regions of the FTIR spectrum that showed the presence of chemical groups were 472.8, 567.1, 604.8, 964.8, and 1028.4  $\text{cm}^{-1}$ , which correspond to  $\text{PO}_4^{3-}$  group (Figure 4). In addition, the bands in 1418.3 and 877.6  $\text{cm}^{-1}$  due to the presence of  $\text{CO}_3^{2-}$ ;

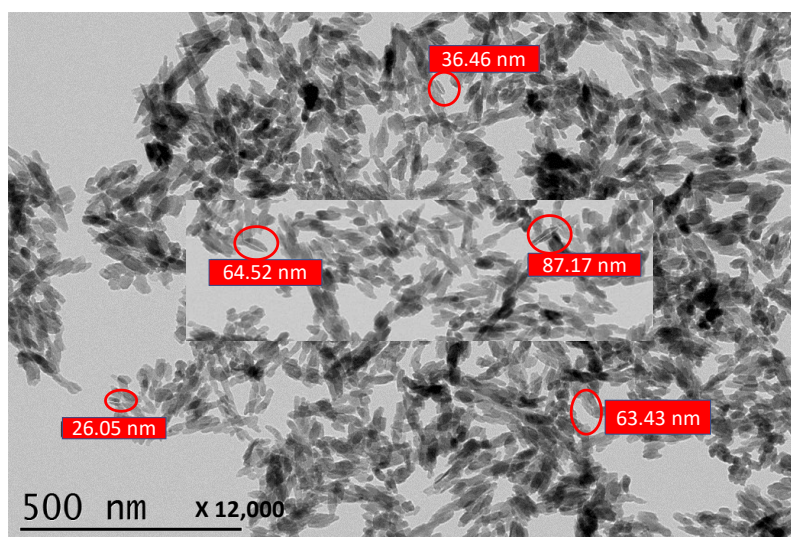


Figura 3. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de hidroxiapatita.  
Figure 3. Transmission electron microscopy micrography of hydroxyapatite nanoparticles.

(pH básico), y el orden de adición de los reactivos durante la formación de los cristales y el periodo de envejecimiento son los factores más relevantes en la formación de cristales de NPHA (García *et al.*, 2006). Al respecto, los máximos del patrón de difracción de rayos X del presente estudio coincidieron con los resultados en polvo nanométrico de hidroxiapatita reportado por Rivera *et al.* (2010).

### Grupos químicos funcionales

Las regiones del espectro IRTF que mostraron presencia de grupos químicos fueron 472.8, 567.1, 604.8, 964.8 y 1028.4  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  (Figura 4). Además, las bandas en 1418.3 y 877.6  $\text{cm}^{-1}$  debido a la presencia de  $\text{CO}_3^{2-}$ ; éste se forma en la mezcla de reacción a partir del  $\text{CO}_2$  atmosférico absorbido durante la síntesis de las NP (Uota *et al.*, 2005). Otras bandas típicas de la HA se presentaron a 3275 y 1639.2  $\text{cm}^{-1}$ ; éstas corresponden a la vibración del grupo OH de la estructura de la HA (Uota *et al.*, 2005). El trazo nítido de las bandas mostró la cristalización esperada de HA.

### Concentración de fósforo disponible en las NPHA

La concentración de P soluble en las muestras de NPHA, respecto al total, varió de 16.9 a 17.7% (169 588 a 17 7025  $\text{mg de P L}^{-1}$ ). Estos resultados fueron similares a los reportados por Sequeda *et al.*

carbonates are formed in the reaction mixture from atmospheric  $\text{CO}_2$  absorbed during the NP synthesis (Uota *et al.*, 2005). Other typical bands of HA were presented at 3275 and 1639.2  $\text{cm}^{-1}$ ; these correspond to the bending of the OH group of the HA structure (Uota *et al.*, 2005). The clear trace of the bands showed the expected crystallization of HA.

### Available phosphorus concentration in NPHA

The concentration of soluble P in the NPHA samples, with respect to the total, varied from 16.9 to 17.7 % (169 588 to 17 7025  $\text{mg of P L}^{-1}$ ). These results were similar to those reported by Sequeda *et al.* These values contrasted with those of the phosphate rock included as a reference in the study, which ranged from 4.2 to 4.7% (40 707 to 47 227  $\text{mg P L}^{-1}$ ). The national phosphate rocks have variable content of P and the solubility is low in some of them (Ordoñez and Castellanos, 1996). Phosphate richness in Mexican continental rocks, such as Zimapán, is comparable to that of Florida and Morocco, but they contain less citrate-soluble P (Alcántar *et al.*, 2016).

### Kinetics of solubility of P in the nutritive solution

The quantification of soluble P in the nutrient solution confirmed its release from the NPHA into this medium (Figure 5). The P solubility was rapid in the first 20 min, but slow after 30 min. The

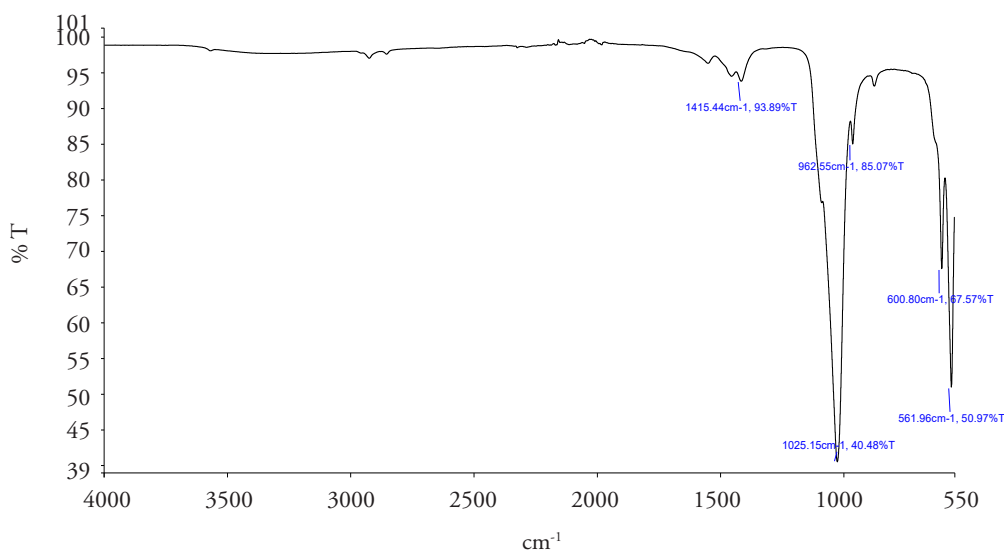


Figura 4. Espectro de IRTF de las nanopartículas de hidroxiapatita producidas por precipitación.  
Figure 4. Diffraction of hydroxyapatite nanoparticles produced by precipitation.

(2012). Estos valores contrastaron con los de la roca fosfórica incluida como referencia en el estudio y que varió entre 4.2 y 4.7% (40 707 a 47 227 mg de P L<sup>-1</sup>). Las rocas fosfóricas nacionales tienen un contenido variable de P y en algunas la solubilidad es baja (Ordoñez y Castellanos, 1996). La riqueza de fosfatos en las rocas continentales mexicanas, como la de Zimapán, es comparable a las de Florida y Marruecos, pero contienen menos P soluble en citrato (Alcántar *et al.*, 2016).

### Cinética de solubilidad de P en solución nutritiva

La cuantificación del P soluble en la solución nutritiva confirmó su liberación de las NPHA a este medio (Figura 5). La solubilidad fue rápida en los primeros 20 min, pero lenta después de 30 min. Esta última se considera responsable del efecto a largo plazo. El P solubilizado fue mayor en la solución nutritiva con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (testigo), que el liberado de las NPHA, lo cual se debe a que la liberación depende directamente de la solubilidad de la fuente fosforada. En este caso, el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> es una sal inorgánica con solubilidad alta en agua (222 g L<sup>-1</sup> a 20 °C); por tanto, la liberación fue rápida y alta. De manera común, esta sal se utiliza como fuente de P en los fertilizantes comerciales; la desventaja es que, si el suelo fija P, éste no está disponible para la absorción por las plantas. La solubilidad de P proveniente de las NPHA es baja en medio acuoso; por lo cual la liberación del P fue paulatina (Figura 5). El P liberado en el tratamiento testigo fue 37% más que el solubilizado de las NPHA a los 90 min. La tasa de liberación de P por hora calculada fue 1.11 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.95) para el fosfato monobásico de potasio y 0.57 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.99) para la hidroxiapatita; por tanto, la liberación de P disminuye en función del tiempo. Esta característica permite asegurar que el P de las NP estará disponible más tiempo en el medio, durante el desarrollo de la planta. Giroto *et al.* (2017) observaron liberación lenta de P de un nanocomposito de urea e hidroxiapatita y alcanzó 90% a las 160 h.

### Efecto de NPHA en la germinación de semillas de frijol

La fitotoxicidad o inocuidad de las NPHA puede evaluarse en la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas. Según la especie que se

depleta de la liberación se considera responsable por el largo-term effect. The solubilized P was higher in the nutrient solution with K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (control) than the one released from the NPHA, which is due to the release depends directly on the solubility of the phosphorus source. In this case, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> is an inorganic salt with high water solubility (222 g L<sup>-1</sup> at 20 °C); therefore, the release was fast and high. This salt is commonly used as a source of P in commercial fertilizers; the disadvantage is that if the soil fixes P, then it is not available for plant absorption. The solubility of P from NPHA is low in an aqueous medium; therefore, the release of P was gradual (Figure 5). The P released in the control treatment was 37% more than the solubilized P from the NPHAs at 90 min. The calculated hourly P release rate was 1.11 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.95) for monobasic potassium phosphate and 0.57 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.99) for hydroxyapatite; therefore, P release depleted as a function of time. This characteristic ensures that the P in NP will be available for a longer period in the medium, during the plant's development. Giroto *et al.* (2017) observed slow P release from a urea and hydroxyapatite nanocomposite, and it reached 90% at 160 h.

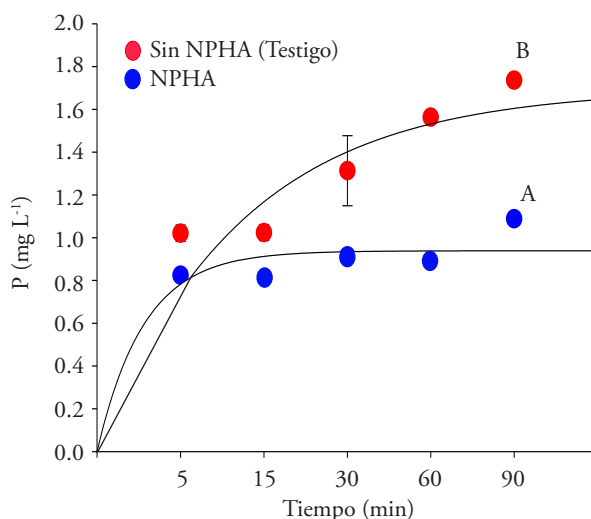


Figura 5. Solubilidad de P de las nanopartículas de hidroxiapatita (NPHA) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en solución de Hoagland.

Figure 5. P solubility of hydroxyapatite nanoparticles (NPHA) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in Hoagland solution.

evalúe, la prueba puede tardar 3 o 4 d. En el presente estudio las semillas de frijol germinaron en 2 o 3 d. En el testigo (sin NPHA), en presencia de NPHA, e independiente de la concentración de P (250 a 1000  $\mu\text{moles de P L}^{-1}$ ) se obtuvo 100% de germinación (Cuadro 2; Figura 6A). Esto mostró la inocuidad de las NPHA en la germinación. Los resultados coincidieron con los reportados por Ortiz *et al.* (2017) con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), en las que no detectaron toxicidad o inhibición aguda de la germinación por NPHA. En contraste, Bala *et al.* (2014) y Liu *et al.* (2015) observaron incremento en la germinación de la semilla y el crecimiento de la

### NPHA effect on bean seeds germination

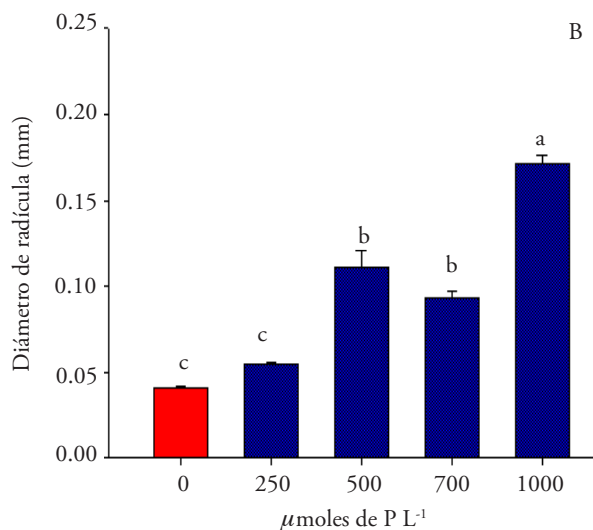
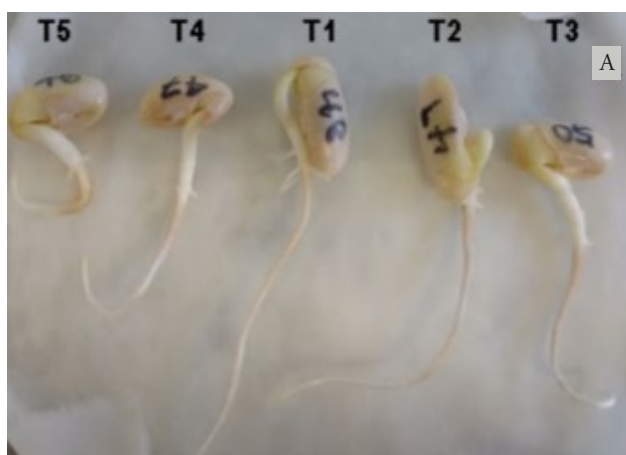
The phytotoxicity or safety of NPHAs can be evaluated in the germination of the seeds and the growth of the seedlings. The test can take 3 or 4 d, depending on the species being evaluated. In this study, bean seeds germinated in 2 or 3 d. In the control (without NPHA), in the presence of NPHA, and independently from the concentration of P (250 to 1000  $\mu\text{mol of P L}^{-1}$ ), 100% germination was obtained (Table 2; Figure 6A). This showed the innocuousness of the NPHAs in the germination. The results matched those reported by Ortiz *et al.* (2017) with

**Cuadro 2. Germinación (porcentaje), biomasa fresca y seca en las plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a  $25 \pm 1$  °C con y sin nanopartículas de hidroxapatita (NPHA) y contenido de P en la plántula.**

**Table 2. Germination (percentage), fresh and dry biomass in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings at  $25 \pm 1$  °C with and without hydroxyapatite nanoparticles (NPHA), and P content in the seedling.**

P ( $\mu\text{moles L}^{-1}$ ) en NPHA	Germinación (%)	Biomasa fresca (g)	Biomasa seca (g)	Contenido de P ( $\mu\text{moles L}^{-1}$ )	
				Eje embrionario	Cotiledones
0	100	1.51 a	0.35 a	7506 ab	6706 b
250	100	1.23 b	0.35 a	7040 ab	6370 b
500	100	1.18 b	0.35 a	6444 b	10605 a
750	100	1.21 b	0.34 a	7416 ab	6071 b
1000	100	1.24 b	0.35 a	8357 a	7000 b

Medias con letras diferentes en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). n=50. ♦ Means with different letters in columns indicate significant statistical differences (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). n=50.



**Figura 6. A) Semillas germinadas de frijol. B) Diámetro de radícula de plántulas de semillas embebidas en suspensiones de nanopartículas de hidroxapatita (NPHA; T1: 0 (testigo), T2: 250, T3: 500 T4: 750 y T5: 1000  $\mu\text{moles de P L}^{-1}$ ).**

**Figure 6. A) Sprouted bean seeds. B) Radicle diameter of seeds seedlings embedded in hydroxyapatite nanoparticles suspensions (NPHA; T1: 0 (control), T2: 250, T3: 500 T4: 750 and T5: 1000  $\mu\text{mol of P L}^{-1}$ ).**

planta de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), así como en el porcentaje de germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.) a una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup> de NPHA.

### Efecto de NPHA en el crecimiento de la raíz de plántulas de frijol

Las diferencias en la longitud de la raíz de las plántulas no fueron significativas (24 h después de la emergencia), en el intervalo de concentración entre 250 y 500  $\mu$ moles de P L<sup>-1</sup> proveniente de las NPHA. En contraste, con las concentraciones de 750 y 1000  $\mu$ moles de P L<sup>-1</sup> su crecimiento longitudinal disminuyó 23.7 y 48.0%, respecto al testigo. Esto coincidió con lo descrito por Liu *et al.* (2015) en sus experimentos de toxicidad aguda en semillas de pepino. Ellos evaluaron NPHA a una concentración equivalente a 2000 mg L<sup>-1</sup> de P y observaron 20% de inhibición en el crecimiento de la raíz. La presencia de NPHA modificó parcialmente el patrón de crecimiento de la raíz, con disminución en la longitud y aumento del diámetro (Figura 7 B), lo que se podría relacionar con el balance de nutrientes en el medio de

lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.), in which they did not detect toxicity or acute inhibition of germination by NPHA. In contrast, Bala *et al.* (2014) and Liu *et al.* (2015) observed increased seed germination and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.), as well as the germination rate of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds at a concentration of 1000 mg L<sup>-1</sup> NPHA.

### NPHA effect on the root growth of bean seedlings

The differences in root length of the seedlings were not significant (24 h after emergence), in the concentration interval between 250 and 500  $\mu$ mol of P L<sup>-1</sup> of NPHA. In contrast, with the concentrations of 750 and 1000  $\mu$ mol of P L<sup>-1</sup>, the longitudinal growth decreased 23.7 and 48.0%, with respect to the control. These results are in line with the report of Liu *et al.* (2015) about the toxicity experiments on cucumber seeds. They evaluated the addition of NPHA at a concentration equivalent to 2000 mg L<sup>-1</sup> of P and observed 20% inhibition in root growth. The presence of NPHA partially modified the root growth pattern, reduced the longitude, but increased the diameter (Figure 7 B), which could be

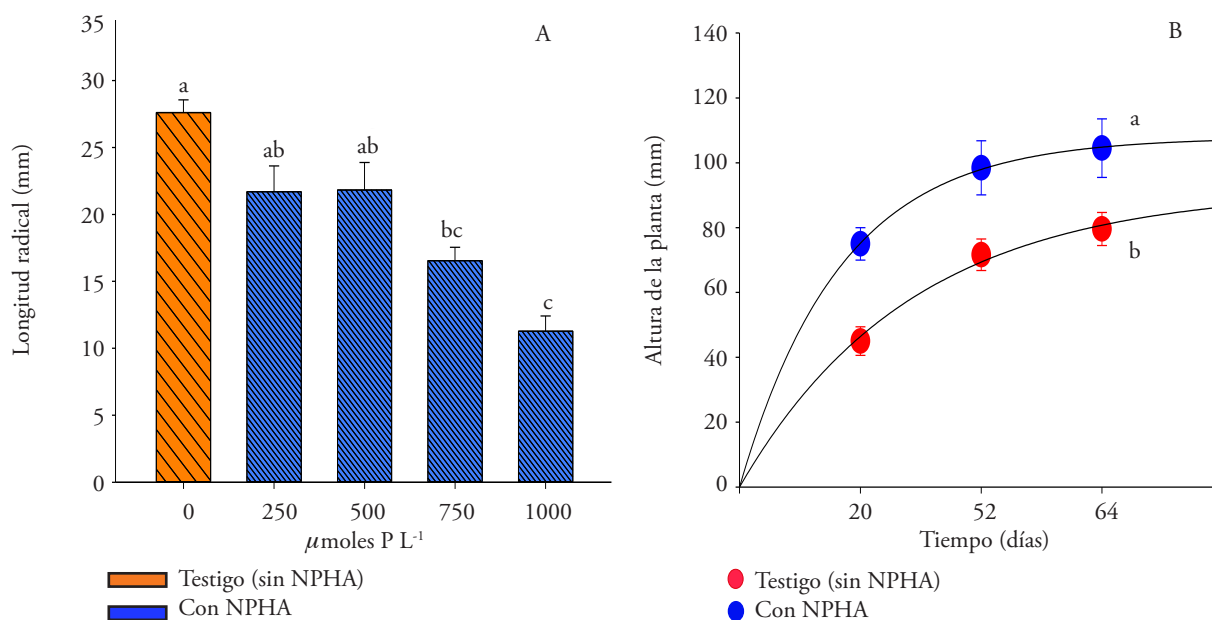


Figura 7. A) Longitud radical de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.; semillas embebidas en suspensiones de nanopartículas de hidroxiapatita NPHA; 250 a 1000  $\mu$ moles de P L<sup>-1</sup>), n = 10. B) Altura de plantas de frijol sin NPHA y con NPHA (20  $\mu$ moles de P L<sup>-1</sup>).

Figure 7. A) Root length of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.; seeds embedded in NPHA hydroxyapatite nanoparticle suspensions; 250 to 1000  $\mu$ mol of P L<sup>-1</sup>), n = 10. B) Height of bean plants without NPHA and with NPHA (20  $\mu$ mol of P L<sup>-1</sup>).

crecimiento (Ward *et al.*, 2008) y la disponibilidad de P, pues Hajabbasi y Shumacher (1993) reportan incremento de la superficie de absorción de la raíz al aumentar la dosis de P en el medio. La arquitectura de la raíz es fuertemente modificada por la disponibilidad de P (Wiliamson *et al.*, 2001). Las raíces del testigo fueron más delgadas (0.06 mm) pero el diámetro aumentó en las que crecieron en presencia de las NPHA (0.17 mm; Figura 6A; tratamientos T3 a T5).

La biomasa fresca de las plántulas del tratamiento testigo fue mayor que la de los otros tratamientos, y es posible que el contenido de agua en las raíces expuestas a las NPHA se haya reducido. Pues la biomasa seca fue similar entre ellos, por lo que la raíz no modificó su crecimiento, independiente de la concentración de NPHA (Cuadro 2).

### Contenido de P en las estructuras seminales de frijol

El contenido de P en el eje embrionario fue mayor en las semillas expuestas a la concentración máxima de NPHA ( $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), aunque en las plantas sometidas a los tres primeros tratamientos no hubo cambios respecto al testigo. En contraste, el contenido de P en los cotiledones fue mayor sólo a una concentración de  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NPHA, y entre los otros tratamientos no hubo diferencias (Cuadro 2).

Al considerar los resultados de concentración de P, se puede argumentar absorción y transporte de fósforo proveniente de NPHA en las estructuras seminales del frijol. Según Corredor *et al.* (2009), otras partículas nanométricas entran en los tejidos. Así mismo, las NPHA en *Glycine max* aumentaron la tasa de crecimiento y el rendimiento de las semillas en 32% y 20%, respectivamente, en comparación con un fertilizante fosforado a granel (Liu y Lal, 2014). La concentración de P en vástago del testigo ( $840 \text{ mg kg}^{-1}$ ) fue muy semejante al tratado con NPHA ( $851 \text{ mg kg}^{-1}$ ); en la raíz fue menor en ambos casos ( $1.3$  y  $1.65 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente) y fueron diferente en las plantas testigos y las tratadas con NPHA.

### Efecto de NPHA en el crecimiento de las plantas de frijol

La altura de las plantas aumentó exponencialmente hasta 65 d después de la siembra. En presencia de

related to the nutrient balance in the growth medium (Ward *et al.*, 2008), and the availability of P, since Hajabbasi and Shumacher (1993) reported a rise in the root absorption surface area by increasing the dose of P in the medium. The root architecture is strongly modified by P availability (Wiliamson *et al.*, 2001). The control roots were thinner (0.06 mm), but the diameter increased in those that grew in the presence of NPHA (0.17 mm; Figure 6A; T3 to T5 treatments).

The fresh biomass of the control treatment seedlings was higher than the other treatments, and the water content in the roots exposed to NPHA may have been reduced. As the dry biomass was similar between them, the root did not modify its growth, regardless of the NPHA concentration (Table 2).

### P content in the seminal bean structures

The P content in the embryonic axis was higher in seeds exposed to the maximum concentration of NPHA ( $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), although in plants subjected to the first three treatments there were no changes concerning the control. In contrast, P content in cotyledons was higher only at a concentration of  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  NPHA, and among the other treatments, there were no differences (Table 2).

When considering the results of P concentration, the absorption and transport of phosphorus from NPHA in the seminal structures of the bean can be argued. According to Corredor *et al.* (2009), other nanometric particles enter the tissues. Likewise, NPHAs in *Glycine max* increased growth rate and seed yield by 32% and 20%, respectively, compared to a regular phosphorous fertilizer (Liu and Lal, 2014). P concentration in the control stem ( $840 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was very similar to the one treated with NPHA ( $851 \text{ mg kg}^{-1}$ ); P concentration in the root was lower in both cases ( $1.3$  and  $1.65 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectively), and was different in the control and NPHA-treated plants.

### NPHA effect on bean plant growth

The height of the plants increased exponentially up to 65 d after planting. In the presence of NPHA, height increased by 66.7, 37.4, and 31.3% at 20, 53, and 65 d after planting, respectively; and was different from the height of control plants

NPHA, la altura aumentó en 66.7, 37.4 y 31.3% a los 20, 53 y 65 d después de la siembra, respectivamente; y fue diferente con respecto a la altura de plantas testigo (Figura 7B). No hubo diferencias estadísticas en la producción de inflorescencias (número), peso, ni longitud de vainas (Figura 8), pero la liberación de P de la NPHA fue suficiente para el crecimiento de la planta hasta la reproducción.

El peso y longitud de las vainas fue similar en los tratamientos con y sin NPHA (Figura 8B-C). Las NPHA como fertilizante de P son eficientes y permiten el desarrollo de estructuras reproductivas. Liu y Lal (2014) indicaron que las raíces de *G. max* absorbieron NPHA, fueron fuente de P y mantuvieron crecimiento saludable.

El intervalo de temperatura para el desarrollo óptimo de las plantas de frijol es 15 a 27 °C (Lardizabal *et al.*, 2013). El periodo de cultivo, primavera-verano de 2018, en el que se desarrolló el estudio fue atípicamente caluroso (CONAGUA, 2018). En el invernadero, aun con la ventilación, la temperatura fue superior a la óptima (entre 28 y 41 °C), 96% de los días de la etapa reproductiva (de prefoliación a llenado de semilla). Además, en

(Figure 7B). There were no statistical differences in inflorescence production (number), weight, neither pods length (Figure 8), but the P release from NPHA was enough for plant growth until reproduction.

The weight and length of the pods were similar in the treatments with and without NPHA (Figure 8B-C). NPHA as a P fertilizer is efficient and allows the development of reproductive structures. Liu and Lal (2014) indicated that *G. max* roots absorbed P, NPHA were a source of P and maintained healthy growth.

The temperature range for optimal development of bean plants is 15 to 27 °C (Lardizabal *et al.*, 2013). The cultivation period in which the study was developed (spring-summer 2018) was atypically hot (CONAGUA, 2018). In the greenhouse, even with ventilation, the temperature was higher than optimal (between 28 and 41 °C) 96% of the days of the reproductive stage (from pre-foiation to seed filling). In addition, in 37% of those days, there was some period of up to 5 h with temperatures above the maximum (34 °C) for bean growth, so it is assumed that the yield and its components were affected (data not shown).

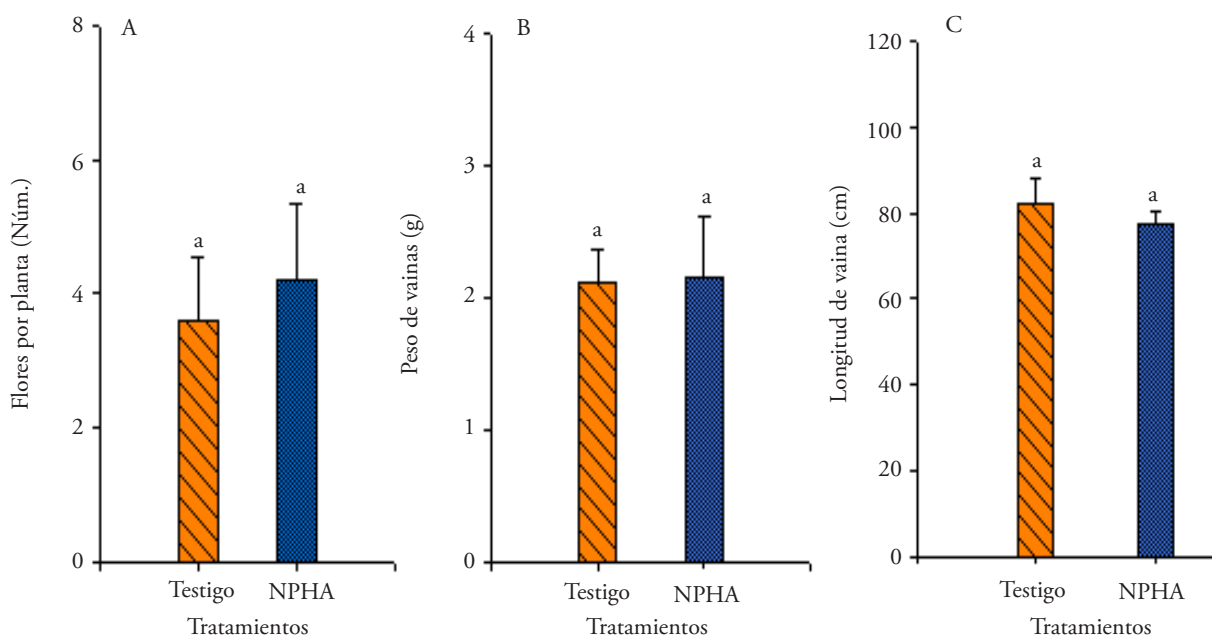


Figura 8. Inflorescencias en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), al inicio de la floración (A), peso (B) y longitud de vaina (C). Testigo (sin NPHA) y con NPHA (20  $\mu\text{mol}$  de  $\text{P L}^{-1}$ ).

Figure 8. Inflorescences in bean (*Phaseolus vulgaris* L.), at the beginning of flowering (A), weight (B) and pod length (C). Control (without NPHA), and with NPHA (20  $\mu\text{mol}$  of  $\text{P L}^{-1}$ ).

37% de esos días hubo algún periodo de hasta 5 h con temperaturas superiores a la máxima ( $> 34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para el crecimiento de frijol, por lo cual se asume que el rendimiento y sus componentes se afectaron (datos no presentados). Por tanto, se consideró que el experimento no fue representativo.

## CONCLUSIONES

Las NPHA, obtenidas mediante la adaptación del método de síntesis química vía húmeda, tuvieron forma de hoja y menor diámetro al reportado por otros autores. Estas nanopartículas no fueron tóxicas en la germinación de semillas de frijol. Sin embargo, el crecimiento longitudinal de la raíz de las plántulas se afectó con concentraciones mayores a  $750\text{ }\mu\text{moles P L}^{-1}$ . El P de las NPHA, aplicado en  $20\text{ }\mu\text{moles}$  en medio hidropónico, promovió un mayor crecimiento de las plantas de frijol en comparación con las fertilizadas con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

La síntesis de NPHA puede ser una alternativa para la liberación controlada de P en la nutrición de las plantas y reducir las pérdidas del elemento aportado por fertilizantes tradicionales; sin embargo, se debe continuar con esta línea de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

La primera autora recibió una beca CONACYT durante sus estudios de Maestría en Ciencias. Se reconoce la crítica constructiva de los revisores anónimos que ayudaron a mejorar el manuscrito.

## LITERATURA CITADA

- Alcántar, G. G., L. I. Trejo T., y F. C. Gómez M. 2016. Nutrición de Cultivos, 2ª edición. Ed. Fundación Colegio de Postgraduados. México. 454 p.
- Bala, N., A. Dey, S. Das, R. Basu, and P. Nandy. 2014. Effect of hydroxyapatite nanorod on chickpea (*Cicer arietinum*) plant growth and its possible use as nano-fertilizer. Iran. J. Plant Physiol. 4: 1061-1069.
- Billard, C. E., C. A. Dalzotto, y V. H. La llana. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. Polibotánica. 38: 69-81.
- Brzezińska-Miecznik, J., K. Haberko, M. Sitarz, M. M. Bućko, and B. Macherzyńska. 2015. Hydroxyapatite from animal bones - Extraction and properties. Ceramics Int. 41: 4841-4846.
- Cameiro-da-Cunha, M., M. A. Cerqueira., B. W. S. Souza, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente. 2011. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean

Therefore, it was considered that the experiment was not representative.

## CONCLUSIONS

The NPHA, obtained through the adaptation of the wet chemical synthesis, had a leaf shape and smaller diameter than those reported by other authors. These nanoparticles were not toxic in bean seed germination. However, seedlings' longitudinal root growth was affected with concentrations higher than  $750\text{ }\mu\text{mol P L}^{-1}$ . The P of NPHA, applied at  $20\text{ }\mu\text{mol}$  in a hydroponic medium, promoted a higher growth of bean plants compared to those fertilized with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

NPHA synthesis can be an alternative for the controlled release of P in plant nutrition and reduce losses of the element provided by traditional fertilizers; however, this research topic should be further investigated.

—End of the English version—

-----\*-----

- hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered film production. Carbohydrate Polymers. 85: 522-528.
- CONAGUA. 2018. Reporte de Clima en México. Año 8, Núm. 7. <https://smn.cna.gob.mx/tools/DATA/Climatolog%C3%ADa/Diagn%C3%B3stico%20Atmosf%C3%A9rico/Reporte%20del%20Clima%20en%20M%C3%A9xico/RC-Julio18.pdf> (Consulta: octubre 2018).
- Corredor, E., P. S. Testillano, M. J. Coronado, P. González-Melendi, R. Fernández-Pacheco, C. Marquina, M. R. Ibarra, et al. 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin Plants: In situ subcellular identification. BMC Plant Biol. 9. doi:10.1186/1471-2229-9-45.
- Degen, A., and M. Kosec. 2000. Effect of pH and impurities on the surface of zinc oxide in aqueous solution. J. Eu. Ceram. Soc. 20: 667-673.
- Eichert, D., C. Drouet, H. Sfhia, C. Rey, and C. Combes. 2009. Nanocrystalline Apatite-Based Biomaterials. Nova Science Publisher, Inc. New York, USA. pp: 3 – 8.
- Engin, N. Ö., and A. C. Tas. 2000. Preparation of porous  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  and  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  bioceramics. J. Am. Ceram. Soc. 83: 1581-84.
- Ferguson, J. M. 1993. AOSA perspective of seed vigor testing. J. Seed Technol. 17: 101-104
- Ferraz M. P., F. J. Monteiro, and C. M. Manuel. 2004. Hydroxyapatite nanoparticles. J. Appl. Biomater. 2: 74-80.

- García, C., C. Páucar, and J. Gaviria. 2006. Study of some parameters that determine the synthesis of hydroxyapatite by the precipitation route. *Dyna Rev. Fac. Nal. Minas* 73: 9-15.
- Giroto, A. S., Gelton G. F. Guimarães, M. F. and C. Ribeiro. 2017. Role of slow-release nanocomposite fertilizers on nitrogen and phosphate availability in soil. *Scientific Reports* 7 (April). Nature Publishing Group. doi:10.1038/srep46032.
- Hajabbasi, M. A., and T. E. Schumacher. 1994. Phosphorus effects on root growth and development in two maize genotypes. *Plant and Soil* 158: 39-46.
- Jenkins, Von R., and R. L. Snyder, 1996. *X-ray Powder Diffraction: An Introduction*. John Wiley & Sons, New York. 391 p.
- Kale, P. A., and N. Gawade, S., 2016. Studies on nanoparticle induced nutrient use efficiency of fertilizer and crop productivity. *Green Chem. Technol. Letters* 2, 88. doi:10.18510/gctl.2016.226
- Koornneef, M., L. Bentsink, and H. Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36.
- Kumar, R., K. H. Prakash, P. Cheang, and K. A. Khor. 2004. Temperature driven morphological changes of chemically precipitated hydroxyapatite nanoparticles. *Langmuir* 20: 5196-5200.
- Lardizabal, R., S. Arias, y R. Segura. 2013. Manual de Producción de Frijol. USAID. file:///C:/Users/User/Downloads/Manual-Frijol-ACCESO%20(2).pdf (Consulta: noviembre 2018).
- Ledesma-Carrión, D. E. 2016. Optimization of Synthesis Process of Nano-Hydroxyapatite. Springer Science Business Media Singapore. Yang G. C., I. Ao S., X. Huang, and O. Castillo (eds). *Trans. Engin. Tech.* pp: 143-153.
- Liu R., and R. Lal. 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Scientific Reports* 4:5686.
- Liu, C., Y. Huang, W. Shen W., and J. Cui. 2001. Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11. *Biomaterials* 22: 301-306.
- Liu, W., S. Wang, H. Sun, O. Zuo, Y. Lai, and J. Hou. 2015. Impact of nanometer hydroxyapatite on seed germination and root border cell characteristics. *RSC Advances*. 5: 82726-82731.
- Lu, C. M., C. Y. Zhang, J. Q. Wen, G. R. Wu, and M. X. Tao. 2002. Research on the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Sci* 21:68-172.
- Malvern Panalytical. 2018. Zeta Potential Theory. In: Malvern Instruments Zetasizer nano Series User Manual. Malvern, Worcestershire, UK.
- Millner, P. D., and D. G. Kitt. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Microbial Systems Laboratory, United States Department of Agricultura. Mycorrhiza* 2: 9-15.
- Murphy, J., and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Anal. Chem. Acta* 27: 31-36
- Ortiz, C. G., R. Carrillo-González, C. A. González-Chávez M., and L. J. López. 2017. Hydroxyapatite nanoparticles synthesis and their toxicity on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agroproductividad* 10: 98-105.
- Pleixats, R., and A. Shafir. 2017. Nanopartículas metálicas solubles para catálisis. *Anal. Quím.* 113: 92-99.
- Preto, M., A. L. Costa, E. Landi, A. Tampieri, and C. Galassi C. 2003. Dispersing behavior of hydroxyapatite powders produced by wet-chemical synthesis. *J. Am. Ceram. Soc.* 86: 1534-1539.
- Rico, C. M., S. Majumdar, and M. Duarte-Gardea. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.* 59: 3485-3498.
- Rivera, J. A., G. Fetter, y P. Bosch. 2010. Efecto del pH en la síntesis de hidroxiapatita en presencia de microondas. *Rev. Materia.* 15: 506-515.
- Sadat-Shojai, M., M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi. 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures. *Acta Biometer.* 9: 7591-7621.
- Sequeda, L. G., J. M. Díaz, S. J. Gutiérrez, S. J. Perdomo, y O. L. Gómez. 2012. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Rev. Colomb. Cienc. Quím.Farm.* 41: 50-66.
- Serway, R. A., and J. W. Jewett. 2004. *Physics for Scientists and Engineers*. Thomson-Brooks/Cole. USA. 1296 p.
- Shaw, A. K., and Z. Hossain. 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* 93: 906-915.
- Solanki, P., A. Bhargava, H. Chipa, N. Jain, and J. Panwar. 2015. Nano-fertilizers and their smart delivery system. In: Rai, M., C. Ribeiro, and L. Mattoso, N. Duran (eds). *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. Springer, Cham. pp: 81-101.
- Stampoulis, D., K. Sinha K., and J. C. White. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 43: 9473-9479.
- Stefanic, M., K. Ward, H. Tawfik, R. Seemann, V. Baulin, Y. Guo, and C. Drouet. 2017. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation. *Biomaterials* 140: 138-149.
- Suvorova E. I., and P. A. Buffat. 1999. Electron diffraction from micro-and nanoparticles of hydroxyapatite. *J. Microscopy.* 196: 46-58.
- Uota, M., H. Arakawa, N. Kitamura, T. Yoshimura, J. Tanaka, and T. Kijima. 2005. Synthesis of high surface area hydroxyapatite nanoparticles by mixed surfactant-mediated approach. *Langmuir* 21: 4724-4728.
- Wang, X., C. Sun, S. Gao, L. Wang, and H. Shuokui. 2001. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosph.* 44: 1711-1721.
- Wang, Z., X. Xie, J. Zhao, X. Liu, W. Feng, J. C. White, and B. Xing. 2012. Xylem-and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environ. Sci. Technol.* 46: 4434-4441.
- Ward, J. T., B. Lahner, E. Yakubova, D. E. Salt, and K. G. Raghothama. 2008. The effect of iron on the primary root elongation of Arabidopsis during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 147: 1181-1191.

- Williamson, L. C., S. P. C. P. Ribrioux, A. H. Fitter, and H. M. Ottoline Leyser. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 875–882.
- Yang, F., C. Liu, F. Gao, M. Su, X. Wu, L. Zheng, F. Hong, and P. Yang. 2007. The improvement of spinach growth by nano-anatase  $\text{TiO}_2$  treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biol. Trace Elem. Res.* 119: 77–88.
- Zhao, L., J. R. Peralta-Videa, C. M. Rico, J. A. Hernández-Viecas, Y. Sun, G. Niu, M. Duarte-Gardea, and J. L. Gardea-Torresdey. 2014.  $\text{CeO}_2$  and  $\text{ZnO}$  nanoparticles change the nutritional qualities of cucumber (*Cucumis sativus*) J. *Agric. Food Chem.* 62: 2752–2759.
- Zhou, H., and J. Lee. 2011. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 7: 2769–2781.
- Zou, Z., K. Lin, L. Chen, and J. Chang. 2012. Ultrafast synthesis and characterization of carbonated hydroxyapatite nanopowders via sonochemistry-assisted microwave process. *Ultrasonics Sonochem.* 19: 1174–1179.

