

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Diseño e Implementación de un Sistema de Liberación Prolongada
de Urea en un Cultivo de Trigo**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Carlos Gregorio Barreras Urbina

Hermosillo, Sonora

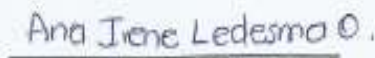
marzo de 2020

APROBACIÓN

Diseño e Implementación de un Sistema de Liberación Prolongada de Urea en un Cultivo de Trigo

M.C. Carlos Gregorio Barreras Urbina


Dr. Francisco Rodríguez Félix
Director de Tesis


Dra. Ana Irene Ledesma Osuna
Secretario de tesis


Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Sinodal de tesis


Dr. Francisco Javier Wong Corral
Sinodal de tesis


Dr. Manuel Pérez Tello
Sinodal de tesis

CESIÓN DE DERECHOS

CESIÓN DE DERECHOS

Hermosillo, Sonora a miércoles 26 de febrero de 2020.

Asunto: Cesión de derechos

UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada Diseño e Implementación de un Sistema de Liberación Prolongada de Urea en un Cultivo de Trigo en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

ATENTAMENTE



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

Carlos G. Barreras U.
M.C. Carlos Gregorio Barreras Urbina

CONTENIDO

APROBACIÓN	i
CESIÓN DE DERECHOS	ii
CONTENIDO.....	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
Trigo.....	6
<i>Triticum aestivum</i>	6
<i>Triticum durum</i>	6
Composición química del grano de trigo	7
Gluten de trigo.....	8
Producción a nivel nacional	10
Fertilizantes.....	10
Urea	11
Fertilizantes de liberación controlada (FLC) y fertilizantes de liberación prolongada (FLP)	14
Modelos de Liberación.....	15
Técnicas de evaluación fisicoquímica.....	15
Microscopia electrónica de barrido.....	15
Cinéticas de absorción de agua	16
Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).....	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Desarrollo del Sistema de Liberación Prolongada de Urea.....	21
Microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).....	21
Cinética de Absorción de Agua.....	21

Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés)	22
Determinación de las condiciones de equilibrio del SLP sin urea	22
Estudio de Liberación Prolongada de Urea.....	23
Modelación Matemática de Liberación de Urea	23
Muestreo y Propiedades del Suelo Agrícola	24
Diseño estadístico de la aplicación del SLPU en el experimento de lixiviación	25
Experimento de lixiviación.....	25
Análisis microbiano del suelo agrícola	26
Microscopía de fluorescencia	27
Eficiencia del Sistema de Liberación Prolongada Urea	27
Muestreo del suelo agrícola	28
Siembra Experimental de Trigo.....	28
Análisis de Calidad de la Planta de Trigo.....	30
Análisis de Calidad del Grano.....	30
Rendimiento	30
Peso de 1000 granos y Peso Hectolítrico	30
Análisis Estadístico	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Desarrollo del Sistema de Liberación Prolongada de Urea (SLPU).....	32
Microscopia electrónica de barrido (SEM)	32
Cinética de absorción de agua.....	37
Análisis de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	40
Experimento de Liberación Prolongada de Urea	44
Determinación de las condiciones de equilibrio del SLP sin urea	48
Modelación Matemática de Liberación de Urea	49
Propiedades fisicoquímicas de los suelos agrícolas	58
Pérdidas de nitrógeno.....	60
Análisis microbiológico.....	65
Microscopía de Fluorescencia.....	67
Degradación del SLPU en condiciones ambientales	70

Análisis de Calidad de la Planta de Trigo.....	72
Análisis de suelo agrícola	83
CONCLUSIONES.....	86
REFERENCIAS.....	87
ANEXOS	97
Anexo 1.....	98
Anexo 2.....	113
Anexo 3.....	144

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Diseño de la siembra experimental de trigo cristalino.....	37
2	SLPU de gluten de trigo con diferentes geometrías; a) geometría de pastilla y b) geometría cilíndrica.....	41
3	Micrografías de SEM de la superficie del SLPU (a) y el SLP sin urea (b) con una magnificación de 100x y las micrografías del SLPU (c) y SLP sin urea (d) con una magnificación de 500x.....	43
4	Micrografías de SEM de la sección transversal del SLPU con magnificación de 75x (a) y 350x (c), micrografías de SEM del SLP sin urea con magnificaciones de 75x (b) y de 350x (d).....	44
5	Cinética de absorción de agua del SLP sin urea y SLPU a 25°C y pH neutro.....	46
6	Espectro de FT-IR del gluten de trigo (a) y la urea (b).....	50
7	Espectro de FT-IR del SLP sin urea (a), SLPU (b) y el SLPU después de la liberación de urea (c).....	51
8	Espectro de FT-IR del movimiento de bandas de la urea (a), SLP sin urea (b), SLPU (c) y del SLPU después de la liberación (d).....	53
9	Cinética de liberación de urea en agua destilada a pH neutro y 25°C.....	54
10	Isoterma de adsorción de urea en agua destilada a 25 °C..	58
11	Isoterma de adsorción de urea de gluten seco en agua destilada a 25 °C.....	59
12	Isoterma de adsorción de urea de gluten seco en agua destilada a 25 °C ajustada a la ecuación de Freundlich.....	60

13	Esquema de liberación de urea en un sistema cerrado de agua destilada a 25 °C.....	61
14	Porcentaje de liberación experimental y calculada de urea de las pastillas con bloqueo.....	64
15	Porcentaje de liberación experimental y calculada de urea de las pastillas sin bloqueo.....	65
16	Pérdidas de nitratos y amonio durante el primer riego de auxilio (A) y el segundo riego de auxilio (B).....	71
17	Descripción esquemática de la aplicación del SLPU; A) Primer riego de auxilio y pérdida de nutrientes y B) segundo riego de auxilio, pérdida de nutrientes y ciclo del nitrógeno.....	74
18	Crecimiento de las comunidades microbianas en Agar Ashby-Manitol; A) suelo del VE, B) suelo del DAGUS y C) colonias similares a partir de ambos suelos. Las flechas rojas indican las colonias.	76
19	Imágenes de fluorescencia usando una magnificación de 10X con tinción DAPI; A1) y A2) SLP sin urea y B1) y B2) SLPU. Flechas rojas indican la viabilidad de los microorganismos.....	77
20	Imágenes del SLPU donde se marca con líneas rojas la zona restante del SLPU después de su aplicación en ambos suelos; DAGUS (A1 y A2) y VE (B1, B2 y B3)	79
21	Macollaje de la planta de trigo bajo diferentes tratamientos de fertilización; A) 0 kg de N ha ⁻¹ , B) y B1) 150 kg de N ha ⁻¹ y C) y C1) SLPU.....	82
22	Altura de la planta a diferentes tiempos y etapas de crecimiento para los tres tratamientos; 0 kg de N ha ⁻¹ , 150 kg de N ha ⁻¹ y SLPU.....	84
23	Cultivo de trigo (<i>Triticum durum</i>) variedad Cirno, antes de la cosecha.....	87

24	Espigas de trigo cristalino (<i>Triticum durum</i>) variedad Cirno bajo tras tratamientos de fertilización; A) SLPU, B) 150 kg de N ha ⁻¹ y C) 0 kg de N ha ⁻¹	90
----	--	----

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Nutrientes primarios para las plantas.....	20
2	Características fisicoquímicas iniciales del suelo proveniente del VE y DAGUS bajo diferentes tratamientos de fertilización.....	67
3	Propiedades fisicoquímicas de los suelos agrícolas después de la aplicación de los tratamientos de fertilización.....	69
4	Porcentaje de nacencia, número de macollos y número de plantas de trigo a diferentes tratamientos de fertilización....	81
5	Rendimientos y análisis de la calidad harinera de los granos de trigo a diferentes tratamientos de fertilización.....	86
6	Análisis de la espiga y el grano de la planta de trigo a diferentes tratamientos de fertilización.....	89
7	Análisis químico del suelo con textura franco-areno-arcillosa, antes y después de la siembra experimenta de trigo cristalino (<i>Triticum durum</i>) variedad <i>Cirno</i> del ciclo 2018 -2019.....	93

RESUMEN

La urea es uno de los fertilizantes de mayor uso a nivel mundial debido a que es capaz de aportar hasta un 46% de nitrógeno. Sin embargo, el nitrógeno aportado por la urea presenta pérdidas al medio ambiente que pueden llegar a ser del 70% hasta el 90% del total aplicado. Las pérdidas de nitrógeno se pueden llevar a cabo mediante procesos lixiviación, desnitrificación y volatilización. El Estado de Sonora es uno de los mayores productores agrícolas del país, siendo el trigo uno de los cultivos de mayor importancia y uno de los cultivos en los cuales la fertilización nitrogenada juega un rol importante. Así mismo, el Estado de Sonora produce alrededor del 54% del trigo producido a nivel nacional. Por lo que, se observa la importancia de este cereal en Sonora, lo cual afecta directamente la economía y el estado social de las comunidades cercanas. Durante esta investigación se diseñó, caracterizó e implementó un sistema de liberación prolongada de urea (SLPU), el cual tiene como objetivo reducir las pérdidas del nitrógeno al medio ambiente, mantener o mejorar las condiciones del suelo agrícola tanto en textura como en variaciones de las comunidades microbiológicas. Además, se analizó el SLPU en un cultivo de trigo donde se midió la calidad del producto obtenido. Se obtuvo un SPLU con morfología de pastilla con un diámetro promedio de 2.46 ± 0.07 cm y una estructura aparentemente homogénea, las micrografías de SEM corroboraron una estructura simétrica con presencia de porosidades tanto en la sección superficial como en la sección transversal. La cinética de absorción de agua demostró que el SLP sin urea presentó un contenido de agua en el equilibrio de $59.15 \pm 0.55\%$, mientras que el SLPU presentó $58.47 \pm 1.50\%$ de agua, es decir, tanto SLP como SLPU tienen la capacidad de absorber y retener agua en la etapa de equilibrio. El análisis de FT-IR mostró una fuerte interacción a través de puentes de hidrógeno entre los grupos amino y carbonilo de la urea y de las proteínas del gluten de trigo. Así como, se demostró la ausencia de la urea una vez que se liberó completamente a partir del SLPU. En el ensayo de liberación, el SLPU logró liberar el 97% de la carga total de urea, en un tiempo de 8 h. Se demostró que la absorción y desorción de urea se basa en la isoterma de Freundlich (Tipo III) y la modelación propone

modelo de transporte de masa unidireccional en el eje Z. Además, durante la modelación matemática para la obtención del coeficiente de difusión efectiva, el SLPU mostró un coeficiente de $D = 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$ con una $R^2 = 0.82$ en el SLPU con bloqueo y $D = 2.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$ con una $R^2 = 0.78$ en el SLPU sin bloqueo, lo cual indicó que el bloqueo de un eje de liberación no mostró mayor efecto. Estos valores, comparables con los reportados en la literatura de productos en venta, fueron favorables. El SLPU aplicado al suelo o durante el experimento de lixiviación logro disminuir las pérdidas de nitrógeno su forma de NO_3^- y NH_4^+ . La eficiencia del SLPU para reducir las pérdidas de nitratos durante el primer riego fue del 73.75% para el suelo Valle de Empalme (VE), mientras que para el amonio fue del 63.33%. La eficiencia de SLPU para nitratos en el suelo del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora (DAGUS) fue del 84.02%, mientras que para el amonio fue del 24.91%. la efectividad de la SLPU para los nitratos durante el segundo riego para el suelo del VE fue del 46,23%, mientras que para el amonio fue del 100%. La eficiencia de SLPU de los nitratos para el suelo DAGUS fue del 27,32%, mientras que para el amonio fue del 87,94%. La variación de la población microbiana para el suelo VE fue de 11,500 CFU/g.s.s. inicialmente y, después de la aplicación del SLPU, aumentó a 100,000 UFC/g.s.s., mientras que el suelo DAGUS fue inicialmente de 6,800 UFC/g.s.s. y, después de la aplicación del sistema, aumentó a 60,000 CFU/g.s.s. El rendimiento de trigo para el SLPU fue mayor presentando $8.05 \pm 0.73 \text{ ton ha}^{-1}$, mientras que para el tratamiento con $150 \text{ kg de N ha}^{-1}$ fue de $6.09 \pm 0.17 \text{ ton ha}^{-1}$ y para el tratamiento con $0 \text{ kg de N ha}^{-1}$ fue de $7.01 \pm 0.40 \text{ ton ha}^{-1}$. Por lo que se concluye que el SLPU tiene la capacidad de funcionar como un fertilizante de liberación prolongada, mantener la calidad del suelo agrícola, aumenta la población microbiana, disminuir las pérdidas de nitrógeno al medio ambiente y por consiguiente obtener un producto de calidad.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años se han utilizado fertilizantes para el desarrollo de plantas y frutos, ya que estos son compuestos químicos que promueven su desarrollo. Su aplicación es de manera foliar y hacia el suelo para promover su absorción por la raíz (Corradini et al., 2010). Existen fertilizantes orgánicos e inorgánicos, los primeros provienen de fuentes naturales y han sido utilizados de generación tras generación, y los segundos son producidos químicamente, siendo éstos los más utilizados para enriquecer el suelo y las plantas (David et al., 2015). Dentro de los fertilizantes producidos químicamente se encuentran los nitrogenados, los cuales son de los más utilizados en campos agrícolas debido a que el N es un elemento primario para la nutrición de la planta. Entre éstos la urea es el más empleado a nivel mundial, ya que proporciona hasta un 46% de N a las plantas, es soluble en agua y es accesible para los agricultores debido a su bajo costo. Sin embargo, el nitrógeno se pierde hacia el medio ambiente por procesos como lixiviación, desnitrificación y volatilización provocando contaminación ambiental, pérdidas económicas para el agricultor, bajos rendimientos de producción y productos de baja calidad comercial. En respuesta a estos inconvenientes, ha surgido la inquietud de desarrollar Fertilizantes de Liberación Prolongada y Controlada (FLP y FLC) (Qiao et al., 2015; Davidson & Gu, 2012).

Un FLP ideal es aquel que está recubierto con alguna matriz polimérica natural, biocompatible y biodegradable, la cual se encarga de retardar la liberación del nutriente y que con una sola aplicación es suficiente para satisfacer las necesidades nutrimentales de la planta (Azeem et al., 2014). Una matriz polimérica ideal puede ser elaborada con proteínas del gluten de trigo, debido a que éstas tienen las características adecuadas para esta aplicación. El gluten de trigo puede ser definido como la masa gomosa que es obtenida después de lavar la masa de trigo para eliminar el almidón. Está constituido principalmente por proteína, la cual va desde 75 hasta un 85% del peso total del gluten (Weiser, 2007), el cual está formado por una fracción de agregado proteico al que se le llama gluteninas y que tiene un peso

molecular desde los 80,000 Da hasta más de 10 millones de Da. Además, contiene una fracción monomérica que tiene un peso molecular que oscila desde 30,000 Da hasta los 60,000 Da (Weiser, 2007). Ambas proteínas pueden ser divididas de acuerdo con su solubilidad, siendo las gluteninas solubles en soluciones ácidas, mientras que las gliadinas lo son en soluciones alcohólicas (Mauricio-Iglesias et al., 2010). El gluten de trigo es accesible para los usuarios, debido a que es obtenido como resultado de la producción de biocombustible y es vendido a bajo precio (Castro-Enríquez et al., 2012).

Al desarrollar un fertilizante de liberación prolongada es importante conocer el comportamiento de éste, por lo que su liberación se puede predecir, explicar y conocer mediante un modelo matemático. Además, el apoyo de un modelo matemático puede ayudar a reducir el número de experimentos que son necesarios a ciertas condiciones de liberación. Esto para poder profundizar en los fenómenos como la difusión, velocidad de liberación, entre otros, los cuales se están llevando a cabo durante el proceso de liberación y son de importancia científica para la aplicación del FLP (Versypt et al., 2013).

Los suelos agrícolas tienen ciertas características que los hacen ser fértiles, y dentro de éstas están el tipo de suelo, la composición química y biológica. Es indispensable conocer el tipo de suelo que se trabaja o en el que se va a aplicar, debido a la estrecha relación que se mantiene entre las características antes mencionadas. Es decir, son éstos los tres factores principales que afectan la fertilidad del suelo y por esto la aplicación de FLP tendrá una gran influencia sobre estas características (Caballero-Mellado, 2006; Andrew et al., 2012). Las poblaciones microbianas presentes en el suelo agrícola son diversas y pueden ir desde microorganismos benéficos hasta sus antagonistas. Entre los principales se pueden encontrar bacterias promotoras del crecimiento de las plantas y algunos hongos como los micorrizógenos, entre otros. Estos microorganismos promueven una especie de sinergismo con las plantas provocando una mejor nutrición de estas,

y un suelo más fértil al aprovechar mejor los nutrientes con los que se cuenta, y con esto promover una mayor asimilación de estos (Andrew et al., 2012).

La agricultura es una de las principales actividades económicas del Estado de Sonora, siendo el Valle del Yaqui uno de los más importantes de México. Dentro de los cultivos de mayor producción se encuentra el trigo, y en el año 2014 el Estado de Sonora produjo el 50% del total de la producción nacional (SIAP, 2014). El problema al que se enfrentan los productores de trigo es que una de las limitantes de la producción y calidad del grano es la fertilización nitrogenada, que se ve reflejada con el fenómeno fisiológico del grano llamado “panza blanca”. Este se caracteriza por un pobre desarrollo del endospermo del grano, mismo que se debe a un déficit de proteína y se expresa como una coloración amarillo claro en el grano. Esta problemática se refleja en la baja calidad de los productos a base de harina de trigo, por lo que causa grandes pérdidas económicas a la industria alimentaria (Rodríguez-Félix et al., 2014).

La producción y comercialización de trigo tiene gran impacto social y económico en el Estado de Sonora, y este problema de fertilización conduce a los agricultores a obtener productos de bajo rendimiento y calidad, sin dejar de lado la contaminación ambiental del nitrógeno perdido.

En la actualidad, se ha estado estudiando el uso de materiales biodegradables y biocompatibles como el gluten de trigo comercial, el cual, en conjunto con la urea, funcione como FLP con potencial aplicación en cultivos agrícolas. Sin embargo, es importante conocer el material utilizado y su liberación, así como su interacción con los componentes del suelo agrícola con el objetivo de aprovechar al máximo el fertilizante lo cual podría representar una potencial mejora ambiental, la obtención de mejores rendimientos y productos de mejor calidad y con esto, lograr una alternativa viable para una agricultura sostenible.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Trigo

El maíz, el arroz y el trigo son los tres cereales más importantes a nivel mundial. El trigo cuenta con una producción mayor a los 600 millones de toneladas por año, lo cual lo posiciona en el tercer cultivo más importante (Shewry et al., 2013; Barlow et al., 2015). La calidad del grano de trigo se basa en la medición de distintas propiedades físicas y de composición, en la cual los requisitos básicos se establecen de acuerdo con el uso final del mismo. El trigo es catalogado como un grano básico, donde las propiedades como el tamaño del grano y su forma influyen en el rendimiento de la molienda y las pérdidas durante el tamizado (Nuttall et al. 2017).

Triticum aestivum

Triticum aestivum o también conocido como trigo panadero, es utilizado industrialmente para la producción de pan y galletas. Es una especie de trigo hexaploide del género *Triticum* y la familia *Gramineae*, esta especie es considerada una de las más importantes a nivel mundial debido a su uso industrial y a la calidad de la proteína del grano, la cual aporta excelentes propiedades reológicas para la industria panadera y galletera. En la clasificación mexicana según la NMX-FF-036-1996, esta especie se encuentra desde el grupo 1 hasta el grupo 4 (Singh et al., 2012; NMX-FF-036-1996).

Triticum durum

Triticum durum es llamado trigo cristalino o trigo duro. Esta es una especie de trigo tetraploide que pertenece al género *Triticum* y a la familia *Gramineae*. Es de las especies de trigo más cultivadas a nivel mundial, además del trigo panadero, y su nombre común es debido a que cuenta con un endospermo vítreo. Es utilizado principalmente para la obtención de semolina, la cual es utilizada para elaborar pastas y productos similares, por lo cual, también puede ser llamado pastero (NMX-

FF-036-1996; Alam *et al.*, 2013; Desai *et al.*, 2011). Por lo tanto, es importante conocer la calidad de la composición nutrimental del grano de trigo, enfocándose principalmente en las proteínas que lo componen, debido a que en esto se basa el uso que se le da a su harina.

Composición química del grano de trigo

El trigo es considerado como un cereal único debido a su composición nutrimental ya que es una rica fuente de carbohidratos, proteínas, minerales, fitoquímicos y vitaminas (Amir *et al.*, 2013). La composición nutrimental consta de 65% - 70% de carbohidratos, del 8% - 20% de proteína, del 3% - 5% de lípidos, mientras que el resto pertenecen a minerales y vitaminas (Peña, 2002). La composición y la concentración de las proteínas, principal factor de calidad del grano de trigo, define las propiedades nutricionales y el uso final de la mezcla de la masa y sus características reológicas como resistencia, tiempo de desarrollo, extensibilidad, descomposición y volumen del pan (Nattall *et al.*, 2017).

El almidón es el carbohidrato que compone el grano de trigo, representando las tres cuartas partes del peso total del grano, el cual está localizado en el endospermo como reserva de energía. Existen varios tipos de gránulos; 1) tipo A que son aquellos que tienen morfología de disco con un diámetro de 10 – 35 μm ; 2) tipo B los cuales tienen morfología esférica con un diámetro de 1 a 10 μm (Peng *et al.*, 1999). El almidón está constituido por amilosa el cual es un polímero lineal unido por enlaces $\alpha(1-4)$ y amilopectina el cual es un polímero ramificado unido por $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$ (Rodríguez *et al.*, 2001).

Los componentes lipídicos del grano de trigo están divididos de acuerdo con su comportamiento en el medio acuoso. Donde, alrededor del 50% de éstos no son polares, como por ejemplo triglicéridos, ésteres, monoglicéridos, diglicéridos y glicolípidos acilados, además de ácidos grasos libres. Mientras que el 50% restante son componentes lipídicos polares como los fosfolípidos y glicolípidos (Georgopoulos *et al.*, 2006).

La composición mineral del grano de trigo está constituida principalmente por Mg, Mn, Ca, Cu, Fe, K, Na y Zn. Así como también cuenta con la presencia de vitaminas como la A, E (α -tocoferol), B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₆ (Piridoxal) y vitamina C (ácido ascórbico) (Plaza et al., 2003).

Las proteínas del grano de trigo son un factor de calidad para la comercialización del grano, por lo que son consideradas el componente de mayor importancia en el grano. Éstas están formando parte de lo que se le denomina gluten de trigo.

Gluten de trigo

El gluten de trigo es un subproducto de la obtención de almidón proveniente del trigo y puede ser definido desde esta industria como “la masa proteica gomosa que es obtenida a partir de lavado con agua para eliminar los componentes solubles y los gránulos de almidón” (Ortolan et al., 2017). A su vez, existe el área de los estudios sobre las sensibilidades hacia el gluten y el Codex Alimentarius, el gluten puede ser definido como “la fracción proteica de trigo, centeno, cebada, avena o sus variedades cruzadas y derivados de los cuales algunas personas pueden ser intolerantes”. Por lo tanto, el gluten comprende las proteínas de almacenamiento de trigo, centeno, cebada y avena (Ortolan et al., 2017). Existe otra definición para gluten de trigo donde es llamado una red proteica formada a partir de interacciones covalentes (enlaces disulfuro) y no covalentes entre las cadenas de gliadinas y gluteninas presentes en la harina de trigo, centeno y granos de cebada. Las principales interacciones no covalentes involucradas en el desarrollo de la red de gluten son los puentes de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas (Wieser et al., 2007; Ortolan et al., 2017). El desarrollo de éstas se produce durante la mezcla de harina y agua, asociado con la energía mecánica para dar una masa cohesiva con características viscoelásticas utilizadas para la preparación de productos de la industria panadera y algunos tipos de galletas, así como productos de pasta (Ortolan et al., 2017).

Gliadinas

Las gliadinas son las principales prolaminas que se encuentran en el trigo. La mayoría de ellas son proteínas monoméricas y representan un grupo heterogéneo debido a las variaciones en la secuencia de aminoácidos que presentan, lo que permite una clasificación de estas proteínas en 3 subunidades; Gliadinas con bajo contenido de aminoácidos azufrados (pobre en S): este grupo está representado por ω -gliadinas, monómeros con un peso molecular de 30,000 a 75,000; gliadinas ricas en aminoácidos azufrados (ricos en S): este grupo está representado por monómeros de $\alpha/\beta,\gamma$ -gliadinas con un peso molecular de 30,000 a 45,000; y gliadinas de alto peso molecular (gliadinas HMW): polímeros que a menudo se clasifican en la fracción de glutenina de bajo peso molecular, aunque son solubles en alcohol (Wieser et al., 2007; Ortolan et al., 2017).

Las gliadinas se clasifican en 3 grupos de subunidades distintas, debido a esto pueden presentar pequeñas diferencias estructurales entre ellas. Las gliadinas contienen un mayor contenido de prolina y glutamina en su estructura y menos residuos de cisteína, evitando así la formación de enlaces disulfuro. Las $\alpha/\beta,\gamma$ -gliadinas presentan cantidades más bajas de prolina y glutamina, y los residuos de cisteína están todos implicados en los enlaces disulfuro intramoleculares (SS) (Wieser et al., 2007; Ortolan et al., 2017).

Gluteninas

Las gluteninas son proteínas poliméricas pertenecientes al gluten de trigo que tienen un peso molecular que oscila desde los 80,000 hasta millones de Da. Las gluteninas se dividen en dos fracciones, las de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés) y las de bajo peso molecular (LMW, por sus siglas en inglés) (Ooms et al., 2018). Esta fracción proteica se encuentra unida mediante enlaces disulfuro entre cadenas, tienen un tamaño variable que pueden ir desde 500,000 hasta más de 10 millones de Da (Wieser et al., 2007). Esta fracción proteica constituye aproximadamente el 50% del gluten de trigo (Wieser et al., 2007; Delcour et al., 2012).

Producción a nivel nacional

La producción de trigo a nivel nacional es de 3,264,672 toneladas, siendo el 54.98% del total nacional, trigo cosechado en el Estado de Sonora, esto equivaldría a 1,795,238 toneladas (SIAP, 2019). Por lo que, el Estado de Sonora es de gran importancia para la producción de este cereal en México. Esto significa una gran dependencia a fertilizantes durante la producción del cereal.

Fertilizantes

Los fertilizantes son compuestos químicos que se utilizan para proporcionar nutrientes a las plantas en los campos agrícolas (Corradini et al., 2010). Debido a esto, la fertilización agrícola es considerada como uno de los principales factores que influyen en la calidad del rendimiento de los productos agrícolas (Ramírez-Wong et al., 2014).

Los fertilizantes orgánicos o también llamados naturales son compuestos muy heterogéneos en los que sus características o aporte de nutrientes pueden variar según su origen y la forma de procesarlo y aplicarlo (Aguilera et al., 2013). Los fertilizantes naturales pueden ser utilizados en combinación con fertilizantes sintéticos para evitar la dependencia de los campos agrícolas de fertilizantes sintéticos únicamente (Akhtar et al., 2011). Las ventajas de la aplicación de fertilizantes naturales es que pueden ayudar a aumentar la actividad enzimática y la respiración del suelo, y también a aumentar la biomasa del suelo (Ge et al., 2010). Otra contribución es que los fertilizantes orgánicos podrían aumentar el contenido de carbono, estabilizar la estructura del suelo y reducir las pérdidas de nitrógeno y fósforo (Tétard-Jones et al., 2013; Lazcano et al., 2013).

Sin embargo, los fertilizantes naturales tienen desventajas como; 1) el contenido de nutrientes es bajo, por lo que requiere grandes volúmenes para satisfacer las necesidades de la planta y 2) la liberación de nutrientes se lleva a cabo muy lentamente, lo que podría contribuir a que la planta se vea afectada por la escasez de nutrientes (Tétard-Jones et al., 2013; David et al., 2015; Aguilera et al., 2013).

El fertilizante natural más común es el compostaje, que es una transformación aeróbica de compuestos naturales en materia orgánica, que puede usarse como fertilizante para cultivos agrícolas sin dañar o dañar el crecimiento de las plantas (Atiyeh et al., 2000). Además, es conocido como el mejor método para el tratamiento de compuestos secundarios naturales para su transformación en materia orgánica con la aplicación de fertilizantes (Atiyeh et al., 2000). Existe una variante de la composta, que se llama vermicomposta, en el que la materia orgánica pasa a través del intestino de una lombriz, comúnmente llamada lombriz de tierra (*Eisenia fetida*, *Dendrobaena ventra*, *Lumbricus rebellus*, *Eisenia andrei*) aprovechando el metabolismo de éstos para aumentar la actividad enzimática bacteriana y obtener un compuesto estable como producto final (Atiyeh et al., 2000). Los fertilizantes orgánicos no se aplican a gran escala para la producción agrícola, su uso es en cultivos pequeños y jardines, mientras que los fertilizantes sintéticos son los más utilizados en el mundo.

Por otro lado, el uso de fertilizantes inorgánicos (químicos) puede conducir al empobrecimiento del suelo agrícola y a la contaminación ambiental (Guo et al., 2016). Sin embargo, su uso es preferido debido a las ventajas que presenta, como la fácil solubilidad en agua y de esta manera las plantas capturan de forma directa y rápida los nutrientes. Además, la contribución de los nutrientes es alta en comparación con los fertilizantes naturales, por lo que con pequeñas cantidades puede satisfacer las necesidades de las plantas (David et al., 2015; Aguilera et al., 2013).

Urea

En los campos agrícolas, el nitrógeno, el fósforo y el potasio forman parte de los nutrientes primarios, los cuales son considerados los principales para la nutrición de la planta. Dentro de los cuales, el nitrógeno es el principal nutriente para el desarrollo los frutos a partir de cultivos agrícolas (Tabla 1). Asimismo, esto lo convierte en un factor limitante de la producción agrícola (Martins et al., 2015;

Tabla 1. Nutrientes primarios para las plantas.

Nombre	Síntoma de deficiencia	Síntoma de exceso
Nitrógeno	Hojas y planta de color verde claro, planta atrofiada y de crecimiento lento.	Hojas y planta de color verde oscuro, susceptible a enfermedades e infestación de insectos.
Fósforo	Se presenta crecimiento lento y achaparramiento. Las hojas viejas presentan coloración púrpura.	Síntomas de deficiencia de Fe, Zn y Mn. Aparecen síntomas por deficiencia de Ca.
Potasio	Bordes de las hojas aparecen quemados. Susceptible a enfermedades e infestación de insectos. Frutos y semillas de baja calidad.	Presentan síntomas de deficiencia de Mg y Ca.

Fuente: Jones, 2012.

Shamim et al., 2015). Las industrias han producido grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados como sulfato de amonio, nitrato de amonio, nitrógeno, fósforo y potasio, y urea, principalmente (Sebilo et al., 2013; Azeem et al., 2014; Ferrari et al., 2015; Shamim et al., 2015). Sin embargo, el fertilizante más utilizado en todo el mundo hoy en día es la urea debido a su alto contenido de nitrógeno (46%), su alta solubilidad, su fácil aplicación y también por ser un fertilizante fácil de producir (Azeem et al., 2014; Martins et al., 2015). Sin embargo, la aplicación de fertilizantes sintéticos como la urea tiene el riesgo de que el nutriente no se utilice por completo y, por procesos fisicoquímicos en el suelo agrícola, el nitrógeno se pierde en el medio ambiente (Qiao et al., 2015). La eficiencia de los fertilizantes nitrogenados como la urea varía del 30% al 40%, lo que indica que el resto se pierde en el medio ambiente por procesos biogeoquímicos como la volatilización del amoníaco (NH_3), la lixiviación de nitrato (NO_3^-) y la pérdida de óxido nitroso (N_2O) a la atmósfera (González et al., 2015; Liu et al., 2015).

La urea se transforma en carbonato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) en presencia de la enzima ureasa y el agua. El carbonato de amonio se somete a un proceso de amonificación para obtener el amonio (NH_4^+) (Cameron et al., 2013; Azeem et al., 2014). Luego, se lleva a cabo el proceso de nitrificación, que es una reducción del amonio, en el que intervienen las bacterias oxidantes de amonio asociadas con la enzima monooxigenasa de amonio para la producción de nitritos (NO_2^-) (Cameron et al., 2013; Azeem et al., 2014). La transformación de nitritos en nitratos (NO_3^-) es catalizada por la bacteria que pertenece al género *Nitrobacter* (Cameron et al. 2013). Teniendo en cuenta que el nitrato es una forma de nitrógeno adecuada para las plantas, este proceso es beneficioso para el crecimiento de las plantas.

Sin embargo, a bajas concentraciones de oxígeno y en presencia de microorganismos anaerobios facultativos, los nitratos se transforman en nitrógeno molecular y óxido nitroso que se pierden en la atmósfera por volatilización (Azeem et al. 2014). A su vez, el amonio producido ingresa al proceso de nitrificación, y una cierta parte de este, en condiciones básicas de pH del suelo agrícola y la presencia

de la enzima ureasa, se convierte en amoníaco, que se volatiliza fácilmente. Estudios recientes han encontrado que la oxidación de amonio anaeróbico (anammox) a través de bacterias anammox autotróficas puede oxidar el amoníaco directamente en nitrógeno molecular sin la liberación de óxido nitroso al medio ambiente (Wang et al.2017). Durante los procesos descritos anteriormente, las formas de nitrógeno se pierden fácilmente en el medio ambiente, incluidos NO_3^- y NH_4^+ , que son absorbidos por la planta para una nutrición adecuada, por lo que la pérdida de nitrógeno conduce a una ineficiencia en su uso, reducción de biomasa, contaminación ambiental, disminución de los rendimientos, productos de baja calidad y, en consecuencia, problemas económicos para los agricultores (Naz & Sulaiman, 2016; Asif et al., 2018).

Fertilizantes de liberación controlada (FLC) y fertilizantes de liberación prolongada (FLP)

Los fertilizantes de liberación controlada (FRC) y los fertilizantes de liberación prolongada (FLP) son una de las alternativas actualmente investigadas para mejorar la fertilización agrícola. Los fertilizantes de liberación controlada y los fertilizantes de liberación prolongada son aquellos en los que el nutriente se libera de forma controlada, lenta o retardada hacia la planta, y satisfacen las necesidades nutricionales de los cultivos agrícolas con una sola aplicación (Azeem et al., 2014). Los sistemas como los FLC y FLP presentan mecanismos de liberación como difusión simple, degradación o erosión de la matriz polimérica lo cual, ayuda a liberar el nutriente desde el interior del sistema hacia el exterior de la matriz polimérica (Calabria et al., 2012).

La diferencia entre un fertilizante de liberación controlada y un fertilizante de liberación lenta o prolongada se basa principalmente en las condiciones y el comportamiento de liberación. En un fertilizante de liberación lenta o prolongada, el patrón de liberación se desconoce con precisión, es decir, las tasas de liberación son inconsistentes y pueden ser impredecibles para factores agrícolas como el tipo

de suelo, las condiciones climáticas y las condiciones generales de los cultivos agrícolas (Azeem et al., 2014). El comportamiento de liberación dependerá de la naturaleza de la materia prima y las características fisicoquímicas de la matriz polimérica, y también de la relación entre la matriz y el fertilizante.

Modelos de Liberación

Los modelos de liberación se aplican para conocer el coeficiente de difusión efectiva lo cual nos permiten imaginar y comprender los mecanismos de transporte que ocurren durante el proceso de liberación de algún fertilizante o componente activo. La difusión y el hinchamiento de las cadenas poliméricas son los principales procesos que pueden regular la liberación del fertilizante a través de la matriz polimérica (Andreetta, 2003). La difusión se lleva a cabo cuando el compuesto activo atraviesa la matriz polimérica estimulado por un gradiente de concentración, alcanzando a un equilibrio en el medio circundante. El hinchamiento se lleva a cabo cuando la matriz polimérica que inicialmente se encuentra en estado cristalino sufre una transición vítrea y se transforma en un hidrogel. Ambos mecanismos están caracterizados por disminuir su velocidad de liberación con respecto al tiempo (Fernández et al., 2010).

Técnicas de evaluación fisicoquímica

Para la caracterización fisicoquímica de los materiales, es necesario utilizar diversas técnicas de evaluación tal como lo son la microscopia electrónica de barrido (SEM), cinéticas de absorción de agua y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). Estas técnicas ayudan a entender de una manera fisicoquímica las características del material desarrollado y, por consiguiente, dar una explicación al comportamiento de este y el posible efecto que el SLPU pueda tener bajo diversas condiciones ambientales.

Microscopia electrónica de barrido

Es una técnica instrumental en la cual se utiliza un microscopio electrónico de barrido, el cual sirve para estudiar y analizar morfologías de estructuras a nivel

micrométrico y nanométrico (Zhou et al., 2007). Las muestras son observadas a una alta resolución, empleando un haz de electrones el cual va a recorrer toda la muestra, previamente cubierta con algún material conductor como el oro. Una vez, que el haz de electrones es irradiado sobre la muestra, la señal es enviada y traducida en un monitor el cual proporciona la morfología y las características de la muestra analizada.

Cinéticas de absorción de agua

Los estudios sobre cinéticas de absorción de agua se utilizan para conocer la capacidad de cierto material para absorber moléculas de agua en sus cadenas poliméricas (Li et al., 2012). Este tipo de ensayos ayudan a determinar la capacidad del material de hincharse, capaz de retener agua y en algunas ocasiones dependiendo de la cantidad de agua que absorban, puede ser clasificado como un hidrogel. El ensayo fisicoquímico consta en poner el material de estudio en contacto con agua, y estar determinando su peso durante cierto tiempo a determinados intervalos de tiempo hasta que el peso llegue a un equilibrio de absorción, el cual indicará que no existe mayor absorción y se ha llegado a un equilibrio (Kim et al., 2003; Li et al., 2012).

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica donde se utiliza la región del infrarrojo del espectro electromagnético, la cual abarca la radiación con números de onda de 12800 hasta 10 cm^{-1} . Este, se divide en tres regiones; cercano, medio y lejano, donde la región cercana está ubicada desde los 12800 hasta 4000 cm^{-1} , la región media abarca desde los 4000 hasta los 200 cm^{-1} y la región lejana abarca desde los 200 a los 10 cm^{-1} . El análisis de FT-IR muestra el resultado de los cambios energéticos que son producidos en las transiciones de las moléculas de estados vibracionales y rotacionales a otros, los cuales pueden ser por absorción, reflexión y emisión. Las transiciones rotacionales son la energía necesaria para provocar un

cambio en los niveles rotacionales, generalmente se da en la región lejana del infrarrojo. En las transiciones vibracionales y rotacionales, los niveles de energía vibracionales son cuantificados y están cercanos a la región del infrarrojo medio. Para determinar los resultados del infrarrojo hay que saber que las posiciones de los átomos no se encuentran de manera fija. Los átomos se encuentran en movimiento en consecuencia de los diversos tipos de vibraciones y rotaciones diferentes alrededor de los enlaces de la molécula. Las vibraciones se distinguen en dos: flexión, la cual es un cambio en el ángulo entre dos enlaces y a su vez son de cuatro tipos (tijereteo, balanceo, aleteo y de torsión), mientras que las vibraciones de tensión son las que suponen un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos (Barth, 2007).

El análisis de FT-IR puede proporcionar información importante en cuanto al material que se desarrolla. Debido a que es importante conocer los grupos característicos y las posibles interacciones entre los grupos funcionales de los compuestos debido a que proporciona información acerca del material desarrollado. Hoy en día es una de las aplicaciones principales de esta técnica, y que en la actualidad es una de las más importantes (Skoog et al., 2001).

HIPÓTESIS

El sistema de liberación prolongada de urea funcionará como un fertilizante de liberación prolongada, que cambiará la composición química y microbiana del suelo para mejorar el rendimiento y la calidad del grano de trigo.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar e implementar un sistema de liberación prolongada de urea en un cultivo de trigo, así como estudiar su efecto sobre la composición química y microbiana del suelo, además determinar el efecto sobre el rendimiento y calidad del grano de trigo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar un sistema de liberación prolongada de urea partir de gluten de trigo y urea.
2. Caracterizar morfológica, fisicoquímicamente el sistema de liberación prolongada de urea utilizando microscopia electrónica de barrido, cinética de absorción de agua, espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.
3. Desarrollar un modelo matemático de liberación de urea.
4. Determinar el efecto del sistema de liberación prolongada de urea sobre la composición química y población microbiana del suelo agrícola.
5. Estudiar el efecto de la aplicación del sistema de liberación prolongada de urea en un cultivo experimental de trigo y el producto cosechado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó gluten de trigo comercial (marca Rockette) y urea (marca Fagalab). Así como, el kit de determinación de urea marca RANDOX, agua destilada, kit para determinación de amonio, nitratos y nitritos (marca Hanna), solución salina 0.85% p/v, Agar Ashby-Manitol, DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), semilla de trigo cristalino *Triticum durum* variedad Cirno

Desarrollo del Sistema de Liberación Prolongada de Urea

El sistema de liberación prolongada de urea (SLPU) se preparó agregando 1 mL de solución de urea 1 M a 0.55 g de gluten de trigo. Los componentes se mezclaron completamente, se amasaron y la geometría del sistema fue ajustada manualmente. Se utilizaron moldes con dos geometrías distintas: 1) pastilla con un diámetro de 2.46 cm y espesor de 0.17 cm, y 2) cilindro finito con un diámetro de 0.81 cm y un espesor de 1.73 cm. Además, se desarrolló un SLP sin urea como muestra blanco. Finalmente, el SLPU y el SLP sin urea fueron congelados y se liofilizaron utilizando un liofilizador marca LABCONCO (modelo FreeZone 6; Kansas City, MO, EE. UU).

Microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

Las características morfológicas de los sistemas se observaron utilizando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL (modelo 5410LV SEM) utilizando un voltaje de 20 kV y 15 kV. Las muestras fueron cubiertas con oro como material conductor, antes de su caracterización morfológica.

Cinética de Absorción de Agua

La cinética de la absorción de agua de las muestras fue llevada a cabo colocando la pastilla en un vaso de precipitado, el cual contenía 400 mL de agua destilada a pH neutro y a una temperatura de 25 °C. El peso de la pastilla fue medido utilizando una balanza analítica a intervalos de tiempo desde 0, 30 y 60 min, después cada 60 min hasta llegar a 720 min. El procedimiento se repitió hasta que no se observó cambios en el peso de la muestra (Li et al., 2012). La cinética de absorción de agua se llevó a cabo utilizando la siguiente ecuación (1).

$$Q = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

m_1 = peso de la muestra seca

m_2 = peso de la muestra a un determinado tiempo (t)

Q = concentración de agua a un determinado tiempo (t), masa de agua por masa de muestra seca.

El procedimiento anterior fue llevado a cabo con el SLP sin urea y con el SLPU. Además, la absorción en el equilibrio de la pastilla fue obtenida utilizando el contenido de agua en el equilibrio (EWC, por sus siglas en inglés) el cual fue calculado mediante la siguiente ecuación (Kim et al., 2003):

$$EWC (\%) = \left(\frac{W_e - W_d}{W_e} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde: EWC (%) es el porcentaje del contenido de agua en el equilibrio, W_e es el peso de la muestra hinchada en el equilibrio y W_d es el peso de la muestra seca.

Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés)

El análisis de FT-IR de las muestras en forma sólida fue llevado a cabo usando un equipo de FT-IR marca Perkin Elmer (modelo Subtech Spectrum) con un aditamento de Reflectancia Total Atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) utilizando un detector de diamante a una longitud de onda de 4000 a 400 cm^{-1} .

Determinación de las condiciones de equilibrio del SLP sin urea

El SLP fue sujeto a pruebas de adsorción para determinar las condiciones de equilibrio aplicando la metodología reportada por Pérez-Tello et al. (2011). Las soluciones de urea fueron preparadas utilizando agua destilada y en concentraciones de 1 mg dL^{-1} hasta 18 mg dL^{-1} , finalmente fueron agregadas a

vasos de precipitado de 500 mL. Se les agregó una fracción del SLP sin urea, previamente pesada, y se mantuvo bajo agitación de 1000 rpm a 25 °C. La medición de la concentración de urea fue llevada a cabo cuando la concentración de urea en la solución llegó a un equilibrio, usando un kit de determinación de urea marca RANDOX, utilizando una longitud de onda de 695 nm. Para esto, se utilizó un espectrofotómetro de UV-vis (VARIAN Cary 50). Los cálculos fueron hechos utilizando la Ecuación 3.

$$q_{Ueq} = \frac{V(C_{Urea\ 0} - C_{Urea\ eq})}{w} \quad \text{Ec. (3)}$$

El ajuste de la isoterma fue realizado utilizando un el software SigmaPlot 10.0 mediante la ecuación de Freundlich ($y=ax^b$).

Estudio de Liberación Prolongada de Urea

El SLPU se colocó en un vaso de precipitado de 1L con agua destilada a pH neutro y a una temperatura de 25°C. El sistema se agitó usando un agitador magnético (IKA C-MAG HS7). Las mediciones de la concentración de urea en el agua destilada contenida en el vaso, se llevó a cabo tomando alícuotas desde 0 a 24 h. Se utilizó el kit para determinación de urea RANDOX y se midió la concentración de urea en el medio usando un espectrofotómetro UV-Vis (VARIAN Cary 50) a una longitud de onda de 695 nm. Las mediciones de concentración de urea se realizaron por triplicado.

Modelación Matemática de Liberación de Urea

Se determinó la ecuación de liberación de urea utilizando la ecuación de continuidad en términos de flux en coordenadas cilíndricas (Ecuación 4). Para lo cual, se tomaron las siguientes consideraciones; mezclado perfecto, volumen constante, temperatura constante, régimen no estacionario, porosidad uniforme, transporte unidireccional Z y equilibrio químico local (desorción de equilibrio).

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} + \left[\frac{1}{r} \frac{\partial (rN_{Ar})}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial N_{A\theta}}{\partial \theta} + \frac{\partial N_{Az}}{\partial z} \right] = R_A \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde:

$\frac{\partial C_A}{\partial t}$ = Concentración de nutriente con respecto al tiempo

$\frac{1}{r} \frac{\partial (rN_{Ar})}{\partial r}$ = Difusión en dirección radial

$\frac{1}{r} \frac{\partial N_{A\theta}}{\partial \theta}$ = Difusión en dirección angular

$\frac{\partial N_{Az}}{\partial z}$ = Difusión en el eje Z

N_A = Moles de urea por unidad de área

R_A = Rx homogénea

Muestreo y Propiedades del Suelo Agrícola

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando dos tipos de suelo agrícola obtenidos de diferentes ubicaciones del Estado de Sonora, México: 1) Valle de Empalme (VE) (28 ° 08'21.0 "N 110 ° 41'43.9" W), y 2) campo experimental del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora (DAGUS) ((Km 21 hacia la costa de Hermosillo (29 ° 00'52.5 "N 111 ° 08'03.9" W)). Ambas muestras de suelo fueron recolectadas utilizando el método de muestreo en diagonal de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Se recolectaron 25 muestras para cada ubicación de suelo, a una profundidad de 25 a 30 cm. Después, para formar una sola muestra por cada ubicación, éstas se mezclaron y se tomó una alícuota para la determinación de las propiedades físicas y químicas.

Los suelos de ambos lugares fueron muestreados utilizando un método de muestreo diagonal de acuerdo con el Estándar Oficial Mexicano (NOM-021-SEMARNAT-2000). Se recolectaron veinticinco muestras para cada ubicación de suelo desde

una profundidad que oscila entre 25-30 cm para formar una sola muestra para cada ubicación y se determinaron sus propiedades físicas y químicas.

Diseño estadístico de la aplicación del SLPU en el experimento de lixiviación

Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar donde los bloques fueron el suelo del VE y el suelo de DAGUS. Se establecieron 3 tratamientos, los cuales fueron; 1) 0 kg de N ha⁻¹ de urea, 2) 150 kg de N ha⁻¹ de urea y 3) SLPU con una concentración de N igual a la de la urea convencional con el fin comparar las pérdidas.

Experimento de lixiviación

Se colocaron 18 recipientes horadados para lixiviación, 9 recipientes para el suelo del DAGUS y 9 recipientes para el suelo del VE. Se utilizó un tratamiento con 0 kg de N ha⁻¹, un tratamiento 150 kg de N ha⁻¹ y, por último, el tratamiento con el SLPU que contenía la misma cantidad de nitrógeno que el experimento comercial. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado. El suelo fue homogenizado y se agregó a cada recipiente horadado para lixiviación a una altura máxima de 30 cm y se colocó tanto la urea convencional como el SLPU a una profundidad de 5 cm.

El experimento se llevó a cabo aplicando un riego de pre-siembra simulando una lámina de riego de 24 cm, se ajustó el volumen a los recipientes horadados utilizando la Ecuación 5.

$$V = hr^2\pi \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde: h es la altura, r es el radio y π es el valor de π .

Se aplicaron tres riegos de auxilio, simulando cada uno una lámina de riego de 12 cm. El lixiviado de cada recipiente horadado fue recogido y homogenizado. Por último, a los lixiviados se les determinó la concentración de amonio, nitratos y nitritos mediante un kit Hanna utilizando un fotómetro multiparámetros HI83200 marca

Hanna Instruments. Para la determinación de amonio se utilizó el método de reducción por cadmio, el cual consiste en que los NO_3 son reducidos a NO_2 , que son determinados por diazotización con sulfanilamida y acomplejamiento con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina para formar un compuesto azo de color que puede ser medido colorimétricamente. Para la medición de nitritos se utiliza una adaptación del método de sulfato ferroso, el cual consiste en generar un compuesto colorido mediante la interacción entre los NO_2 y el sulfato ferroso para generar color, donde la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración del analito. El amonio es medido mediante el método de Nessler, donde el reactivo Nessler reacciona con el amoníaco, bajo fuertes condiciones alcalinas, y forma un complejo de color amarillo. La adición de una solución EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) inhibe la precipitación de iones de calcio y magnesio debido a la presencia del reactivo alcalino Nessler, mediante la conversión de amoníaco a amonio, se obtiene la concentración de amonio. Por último, las muestras de suelo se homogenizaron por cada localidad y por cada tratamiento, y finalmente fueron enviadas a un laboratorio especializado para su análisis de fertilidad y salinidad.

Análisis microbiano del suelo agrícola

El aislamiento de microorganismos se realizó utilizando la metodología reportada por Vital-López et al. (2015). Las muestras de suelo se tamizaron a través de una malla con un tamaño de poro de 2 mm. El suelo se suspendió en solución salina (0,85% p/v) y las diluciones en serie se llevaron a cabo de 10^{-1} a 10^{-6} con solución salina (0,85% p/v).

Después, se preparó agar Ashby-Mannitol como medio para el crecimiento de los microorganismos. Las placas fueron incubadas durante 4 - 5 días a 37°C utilizando una incubadora (modelo Thermolab TE-I45DM). Las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC/gds) se cuantificaron y se realizó la observación de las características macro y microscópicas de las colonias mediante la tinción gram utilizando un microscopio binocular Olympus (modelo CX31RTSF) con una cámara Infinity 1 Olympus (Adaptador de montaje modelo U-CAMD3/U-

TV1X-2, Japón). Además, se aislaron colonias similares entre ambas muestras de suelo DAGUS y VE, y se utilizó el microorganismo con las mismas características como microorganismo guía (GMI) para mostrar el efecto del SLPU en la población microbiana.

Microscopía de fluorescencia

El SLPU fue probado para determinar su capacidad para mantener la viabilidad de microorganismos. El SLPU fue inoculado con GMI que fue aislado del suelo de ambas localidades (VE y DAGUS). Para esto, la muestra del microorganismo que creció en Agar Ashby-Manitol fue inoculada en caldo nutritivo y se incubó durante 24 a 48 h en una incubadora (modelo Thermolab TE-I45DM). Posteriormente, se inocularon 20-50 μL de caldo nutritivo en el SLPU y se expandió sobre el sistema hasta asegurar su ingreso.

El SLPU fue incubado de 24 a 48 h, luego se tiñó con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol). La viabilidad de los microorganismos en el SLPU se observó utilizando un microscopio invertido (Leica Microsystems CMS GmbH Modelo DMI8, EE. UU.) con un filtro de fluorescencia (filtro de excitación DAPI 350/50 y filtro de emisión 460/50) y una cámara refrigerada DFC 450C (Leica). Las imágenes se procesaron utilizando el software Overlay of fluorescence (LAS AF versión 3.1.0, Leica Microsystem, EE. UU.) (Hernández-Téllez et al.2018).

Eficiencia del Sistema de Liberación Prolongada Urea

La eficiencia del sistema de liberación se determinó restando los resultados del tratamiento sin fertilizante al tratamiento con 150 kg de N ha^{-1} y el tratamiento con el SLPU. Mientras que se tomó como base el tratamiento con 150 kg de N ha^{-1} para determinar la diferencias entre las pérdidas del SLPU y el tratamiento con 150 kg de N ha^{-1} .

Muestreo del suelo agrícola

Se muestreó el suelo agrícola utilizando un muestreo en diagonal, según las indicaciones de la NOM-021-SEMARNAT-2000 para determinar las condiciones fisicoquímicas del mismo antes de su uso para la siembra experimental de trigo. El suelo fue enviado a un laboratorio especializado para su análisis y determinar las condiciones de salinidad y fertilidad.

Siembra Experimental de Trigo

La siembra experimental de trigo se realizó en el Valle de Empalme ubicado en las coordenadas 28°08'21.0"N 110°41'43.9"W. Se utilizaron tres tratamientos; 1) 0 kg de N ha⁻¹, 2) 150 kg de N ha⁻¹ y 3) SLP, todos los tratamientos fueron aplicados por triplicado. El diseño experimental de la siembra fue un diseño completamente al azar, el cual se muestra en la Figura 1, se utilizó semilla de trigo cristalino *Triticum durum*, una densidad de siembra de 80 kg ha⁻¹, se sembró a doble hilera y se aplicó un riego de pre-siembra con una lámina de riego de 24 cm, un riego de ayuda de nacencia con una lámina de riego de 12 cm, un riego ligero con una lámina de riego de 12 cm y 5 riegos de auxilio con una lámina de riego de 14 cm.

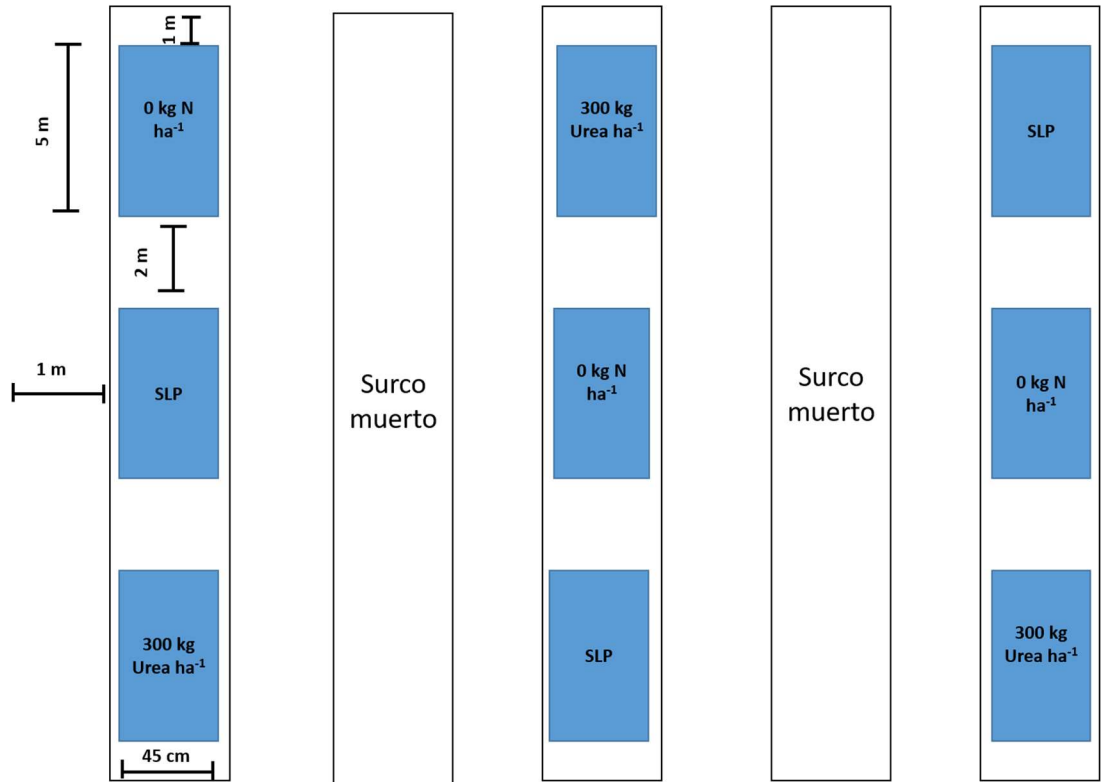


Figura 1. Diseño de la siembra experimental de trigo cristalino

Análisis de Calidad de la Planta de Trigo

Se obtuvo el porcentaje de nacencia cuantificando las plántulas que nacieron de acuerdo con el número de semillas que se aplicaron por tratamiento, el resultado fue reportado en términos de porcentaje. El número de macollos o hijuelos fue cuantificado basándose en el conteo de 10 plantas por metro cuadrado por cada tratamiento. El número de plantas totales que se desarrollaron por cada tratamiento y su repetición fue cuantificado. A su vez, la altura de la planta a distintos tiempos de crecimiento (2, 3 y 4 meses) fue medida, utilizando una cinta métrica en 10 plantas por metro cuadrado para cada tratamiento. El análisis de la longitud de la espiga, granos por espiga y peso de la espiga se llevó a cabo colectando 30 muestras de espigas por metro cuadrado para cada tratamiento. Esto se realizó para cada tratamiento, por lo que se colectaron por tratamiento 30 muestras de espigas para su posterior análisis de calidad. Se pesó la espiga en su estado natural, se cuantificó el número de granos que contenía cada espiga, se pesaron los granos una vez separados de la espiga.

Análisis de Calidad del Grano

Rendimiento

Se cuantificó el rendimiento del grano de trigo en toneladas por hectárea. Se hicieron los cálculos de acuerdo con el área (5 m^2) que abarcó la siembra para cada tratamiento y se extrapoló para convertirlo en toneladas por hectárea.

Peso de 1000 granos y Peso Hectolítrico

Se analizó la calidad harinera del grano de trigo a través del peso de 1000 granos y el peso hectolítrico acorde a la norma oficial NMX-FF-036-1996.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los valores obtenidos de la cinética de hinchamiento, cuantificación de nitratos y amonio y por último a los análisis de calidad de la planta y del grano se evaluaron con un 95 % de confianza y

comparación de medias de Tukey con $p>0.05$ utilizando el paquete estadístico InfoStat. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo del Sistema de Liberación Prolongada de Urea (SLPU)

La figura 2 muestra las imágenes del SLPU en forma de pastilla (2.46 ± 0.07 cm de diámetro promedio, 0.17 ± 0.02 cm de espesor promedio) y con geometría cilíndrica (0.81 ± 0.03 cm de diámetro promedio, 1.73 ± 0.13 cm de longitud promedio) (Fig. 2a, b, respectivamente). Figura 2a se puede observar una estructura homogénea sin porosidades aparentes y una circunferencia con espesor uniforme en comparación con la geometría cilíndrica. Además, la geometría cilíndrica muestra una alta porosidad, y su estructura no es completamente uniforme debido a que, durante la elaboración, se obtuvo un diámetro mayor en ambos extremos del cilindro, lo cual muestra una estructura geométrica no homogénea. Por lo tanto, debido a estas características físicas y al desarrollo del SLPU, se clasificó como el SLPU más homogéneo como el ideal para el desarrollo de esta investigación, es decir, la geometría más adecuada para llevar a cabo los experimentos la pastilla.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En esta sección se presentan las micrográficas de SEM transversales y superficiales del SLP sin urea y el SLPU. La Figura 3 muestra micrográficas de SEM de la superficie del SLPU (a) y del SLP (b), ambas con un aumento de 100x. Así también, se muestra las superficies de SLPU (c) y SLP sin urea (d) con un aumento de 500x, en el que se puede observar que el SLPU muestra una superficie asimétrica representada por las fracciones huecas y los poros a escala micrométrica que este presenta. La Figura 4 muestra las micrográficas de SEM de la sección transversal del SLPU utilizando aumentos de 75X (a) y 350X (c), mientras que las micrográficas SLP sin urea se muestran con aumentos de 75X (b) y 350X (d). Estas micrográficas muestran la sección transversal la cual cuenta con una estructura asimétrica, revelando poros micrométricos y canales dentro del SLPU y del SLP sin urea. Los poros en las estructuras asimétricas del SLPU y del SLP sin urea probablemente se formaron en el momento de la extracción del agua mediante el proceso de liofilización. Estos espacios huecos proporcionan la formación de poros y canales

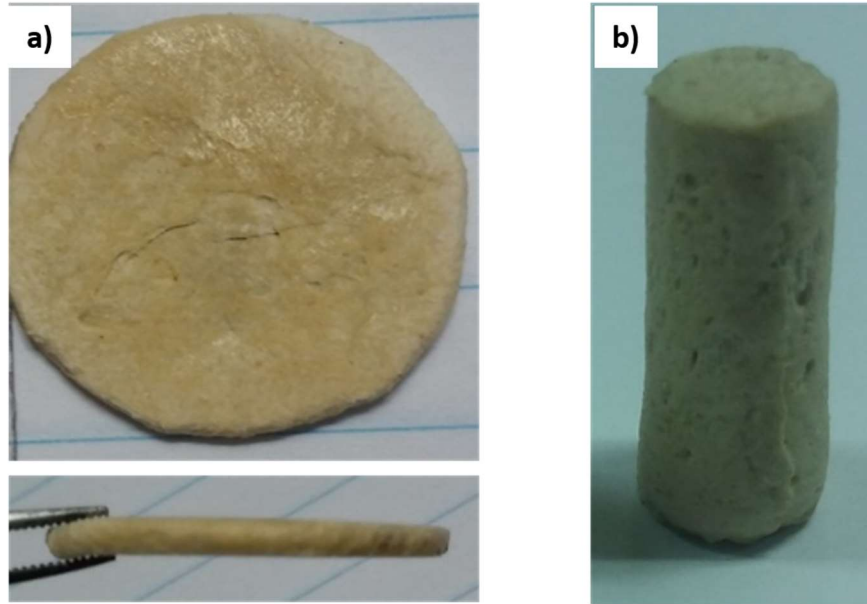


Figura 2. SLPU de gluten de trigo con diferentes geometrías; a) geometría de pastilla y b) geometría cilíndrica.

y canales en el interior. Estos espacios huecos proporcionan la formación de poros y canales en el interior. Probablemente esto se deba a que durante el desarrollo del SLPU y la SLP sin urea, una parte del proceso comprende el amasado del sistema y luego la formación de la geometría de la pastilla. Durante la mezcla de la urea y el SLP, las burbujas de aire probablemente se sumergen en la matriz, y cuando se ajusta el diámetro y los sistemas se congelan, se forman ciertas porosidades en la superficie y espacios huecos en el interior. Sin embargo, el aumento en el diámetro de las porosidades mostradas en el SLPU es aparentemente mayor que el de las porosidades exhibidas por el SLP sin urea; esto podría deberse al tiempo de contacto entre la urea y el gluten de trigo. Según la literatura, con un alto tiempo de contacto entre el agente reticulante y el material polimérico, las porosidades tienden a expandirse, es decir, los poros se abren y aumentan de diámetro (Qiao et al., 2014). Existen tres factores que durante el desarrollo de este material afectan el diámetro del poro: para el SLPU 1) atrapamiento de aire durante la combinación de la solución de urea y gluten de trigo, 2) la concentración de urea utilizada durante la mezcla y 3) el tiempo de exposición antes de ser congelado y liofilizado. La solución de urea provocó una reticulación de las cadenas poliméricas, por lo que podrían haberse formado poros y canales de interconexión dentro del sistema. Sin embargo, al momento de amasar y moldear el sistema, el aire quedó atrapado en la mezcla de gluten y urea. Después, aunado al efecto del tiempo de reticulación, las cadenas poliméricas fueron más ramificadas y alargadas. Sin embargo, esto sucedió alrededor de los poros, cuando se extrajo el agua, la mezcla de gluten y urea alrededor del poro no se condensó. Finalmente, el diámetro no disminuyó (Chavda et al., 2011). Estas características son una parte importante para comprender el comportamiento del material. Es posible que, a través de la fracción hueca, el agua ingrese y rompa las interacciones entre las proteínas y la urea, y el proceso finalice con la salida de la urea disuelta en el agua hacia el exterior de la pastilla a través de la fracción hueca, ya sea a través de los poros, canales o microporos.

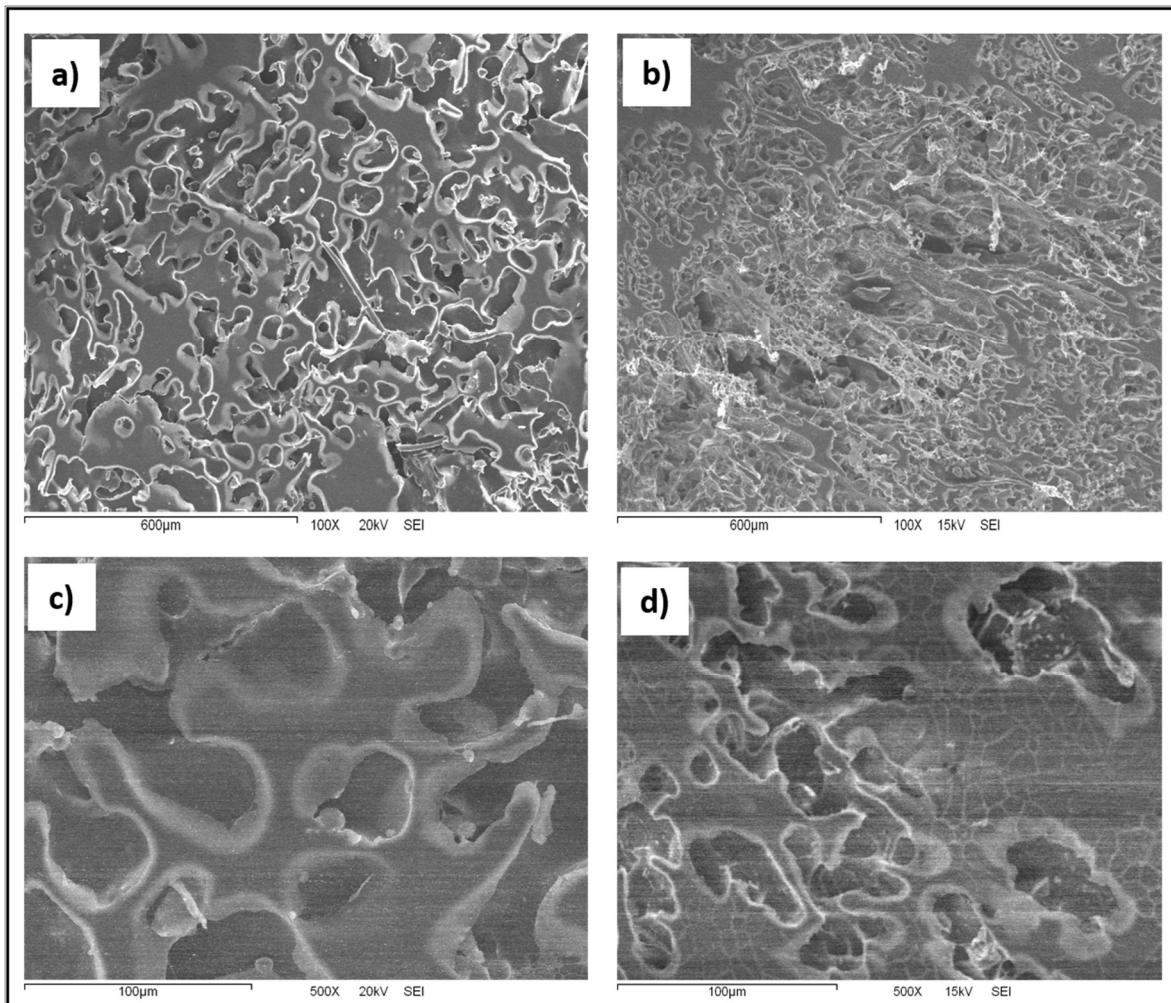


Figura 3. Micrografías de SEM de la superficie del SLPU (a) y el SLP sin urea (b) con una magnificación de 100x y las micrografías del SLPU (c) y SLP sin urea (d) con una magnificación de 500x.

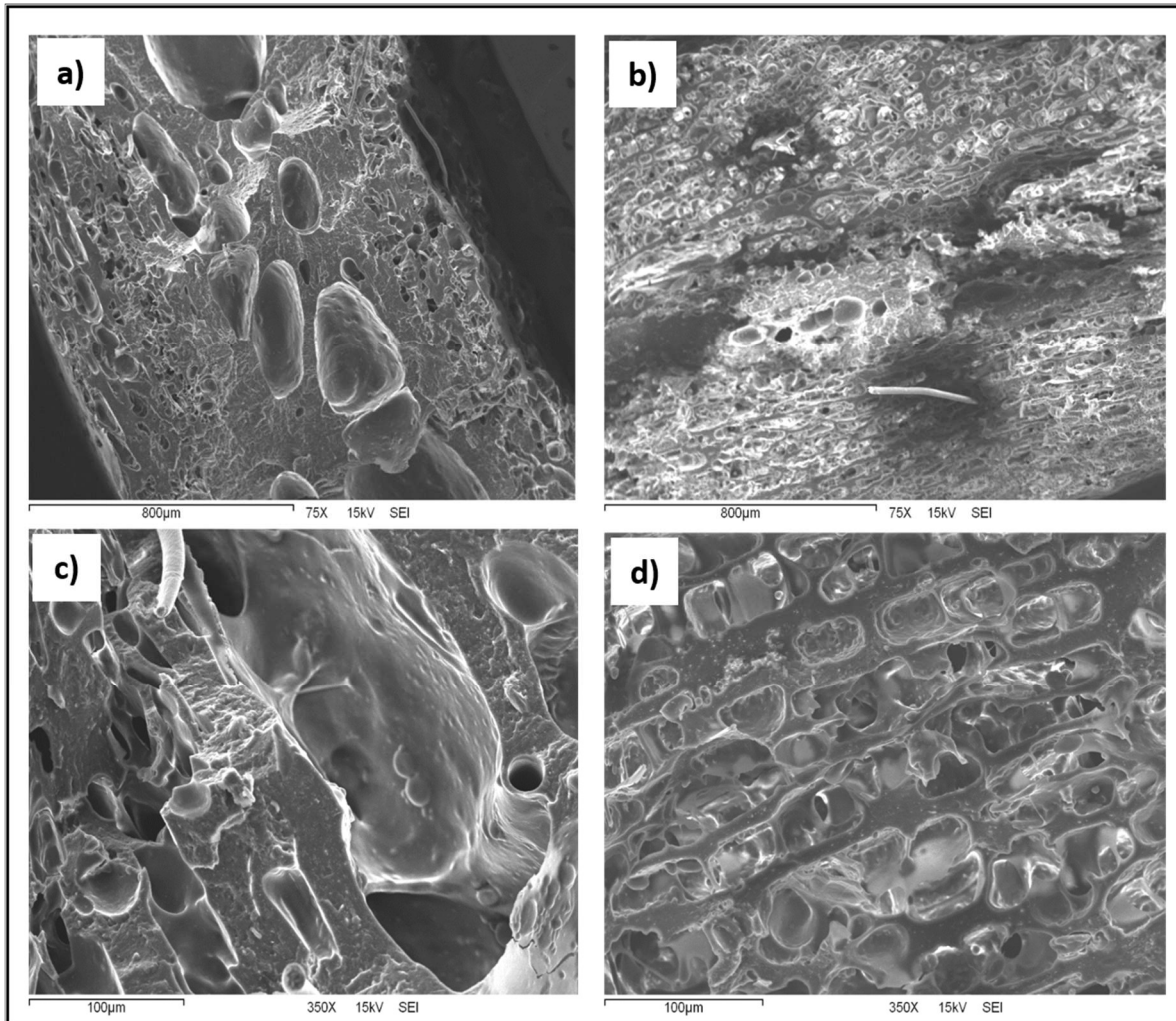


Figura 4. Micrografías de SEM de la sección transversal del SLPU con magnificación de 75x (a) y 350x (c), micrografías de SEM del SLP sin urea con magnificaciones de 75x (b) y de 350x (d).

Esto podría acelerar el transporte de la urea al exterior de la pastilla. Xiao y col. (2017) prepararon un hidrogel superabsorbente basado en almidón, con función de fertilizante de liberación prolongada (FLP). Los autores encontraron, a través de las micrografías SEM, que el material no presentaba redes tridimensionales, es decir, la presencia de partes huecas o poros. Sin embargo, estas características están presentes una vez que el material se hincha, lo que podría indicar, en comparación con las pastillas, que también posee la capacidad de absorber agua e hincharse, para poderse comportar como un hidrogel. Sin embargo, los poros y las fracciones huecas presentadas en la pastilla podrían aumentar su diámetro y volumen y fomentar una mayor formación de la red tridimensional, en comparación con su estado inicial, como ha demostrado el estudio de Xiao et al. en 2017.

Cinética de absorción de agua

La Figura 5 muestra la cinética de absorción de agua del SLP sin urea y el SLPU. Las muestras revelaron una rápida absorción de agua durante los primeros 200 minutos, mientras que después de ese tiempo, se produce una hinchazón gradual hasta alcanzar un equilibrio a los 600 minutos. El SLP sin urea y el SLPU exhibieron este comportamiento, que puede ser causado por la porosidad asimétrica. Al principio, hubo una mayor velocidad de hinchamiento, y esto disminuyó hasta alcanzar el equilibrio. Este comportamiento es dado por la presión osmótica, es decir, a mayor presión osmótica, más rápida es la velocidad de consumo de agua (Li et al., 2012). Por lo tanto, a medida que disminuye la diferencia en la presión osmótica, disminuye la velocidad de hinchamiento. Este comportamiento es consistente con el reportado por Li et al. (2012) para un material superabsorbente de paja de trigo, que mostró una velocidad de hinchamiento rápida durante los primeros 50 min, mientras que luego se observó un hinchamiento gradual, logrando un equilibrio a los 300 min.

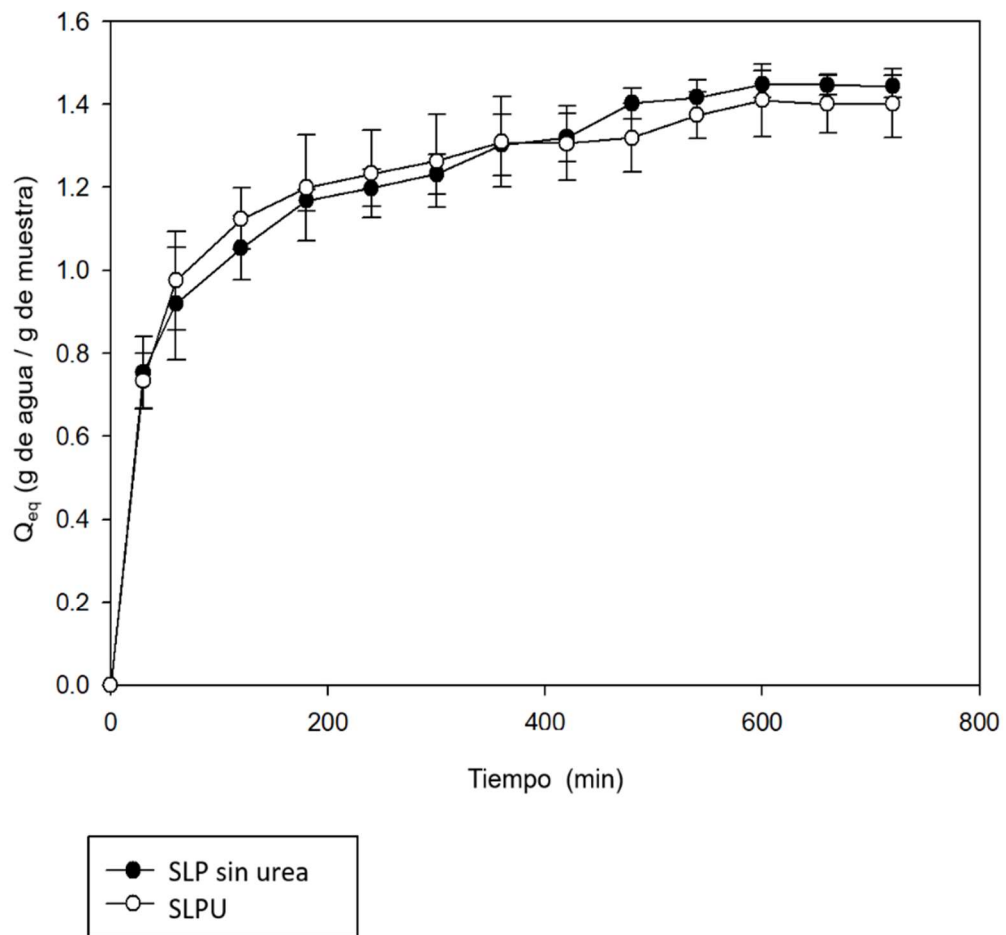


Figura 5. Cinética de absorción de agua del SLP sin urea y SLPU a 25°C y pH neutro.

Por otro lado, el SLP sin urea mostró valores del contenido de agua en el equilibrio de $59.15 \pm 0.55\%$, mientras que el SLPU presentó $58.47 \pm 1.50\%$ de agua, es decir, tanto SLP sin urea como SLPU tienen la capacidad de absorber y retener agua en la etapa de equilibrio. El contenido de agua entre ambas muestras presenta una diferencia de 0.68% . Esto indica que la urea no ejerce un efecto sobre el hinchamiento del SLPU. Es posible que el contenido de agua esté influenciado por las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas (dadas por la composición de aminoácidos como prolaminas, glutamina, tirosina y cisteínas), interacciones iónicas y electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y principalmente puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y las cadenas poliméricas, es decir, las cadenas poliméricas tienen la capacidad de retener agua dentro de su estructura (Nandi et al., 2005; Hammann et al., 2014). Con respecto a la relación entre SEM y la cinética de absorción de agua, es importante tener en cuenta que el SLP sin urea tiene diámetros de poro más pequeños pero una mayor cantidad de ellos en comparación con el SLPU. Sin embargo, mientras que el SLP sin urea presenta un mayor número de poros, su área de contacto es más grande que la de SLPU.

El SLP sin urea presenta un mayor número de poros, el área de contacto es más grande que el área que presenta el SLPU. Esto significa que el SLP probablemente tiene la capacidad de retener más gramos de agua por gramos de gluten seco (Q). La absorción de la solución en el material se basa en dos mecanismos característicos tal como lo reporta Zaleski et al. (2019): (1) el hinchamiento del material no poroso que se lleva a cabo por las interacciones fisicoquímicas entre el material y el disolvente con el que el primero está en contacto y (2) una condensación capilar que puede existir debido a la estrechez de los poros que existen en el material dado por las paredes de polímero. Ambos procesos pueden llevarse a cabo al mismo tiempo, lo que influye en la absorción de la solución y, a su vez, en la interacción de la urea con las paredes de los poros de menor y mayor diámetro.

Se ha reportado que la absorción de agua entre las cadenas poliméricas está dada por moléculas de agua que son ubicadas entre los espacios intersticiales de las cadenas poliméricas, lo que trae como resultado la relajación de estas cadenas (Ozel et al., 2017; Rizwan et al., 2017). Esto se ve favorecido por la presencia de grupos funcionales hidrófilos, tales como ácidos carboxílicos ($-\text{COOH}$), grupos carbonilo ($\text{C} = \text{O}$), grupos $-\text{OH}$ y grupos amino ($-\text{NH}_2$) (Rizwan et al., 2017; Dórame-Miranda et al., 2018).

La presencia de urea ayuda a la reticulación de las cadenas poliméricas y evita su disolución por el efecto de las moléculas de agua presentes en ellas (Rizwan et al., 2017). Esto puede llevar al SLP sin urea y al SLPU a absorber y retener agua y, al mismo tiempo, tener la capacidad de presentar el fenómeno de difusión hacia el exterior del SLP sin urea y el SLPU. Por otro lado, el SLP sin urea y el SLPU, de acuerdo con las capacidades descritas anteriormente, se pueden clasificar como materiales con capacidad de hinchamiento. Estos materiales pueden ayudar a mejorar las propiedades físicas del suelo agrícola, retener agua y nutrientes y lograr mejores condiciones del suelo (Rizwan et al., 2017).

Análisis de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

La Figura 6 muestra el espectro de FT-IR del gluten de trigo (a) y la urea (b). El gluten de trigo presenta una banda de intensidad media a 1652 cm^{-1} y una banda de intensidad débil a 1535 cm^{-1} , y estas bandas corresponden al estiramiento vibratorio de la amida I ($\text{C} = \text{O}$) y la frecuencia de vibración de la amida II ($\text{N}-\text{H}$), respectivamente. La urea presenta dos regiones a 3436 cm^{-1} y 3330 cm^{-1} que son características de la amina primaria (vibración del $\text{N} - \text{H}$). Además, presenta una banda característica de alta intensidad del grupo carbonilo ($\text{C} = \text{O}$) a 1678 cm^{-1} . Las bandas reportadas para gluten de trigo y urea son las bandas características reportadas por Castro-Enríquez et al. (2012) y Barreras-Urbina et al. (2018). La Figura 7 muestra el SLP sin urea (a), SLPU (b) y el SLP sin urea después de la liberación de urea (c). El SLP sin urea presenta una banda de intensidad fuerte a

1635 cm^{-1} que corresponde a la amida I (C = O) y la presencia de una banda de intensidad media a 1533 cm^{-1} que corresponde a la frecuencia vibratoria de la amida II (deformación del N –H). Además, el SLP sin urea presenta el estiramiento del grupo –CH₂– a 2926 cm^{-1} , y la vibración del estiramiento del N – H de las proteínas está dada por la presencia de la amida A y la amida B, que se localizan a 3281 cm^{-1} y 3070 cm^{-1} , respectivamente. Estas bandas corresponden a lo reportado por Zhang et al. (2019), donde ubica a la amida A a 3293 cm^{-1} y las vibraciones de estiramiento de N–H y –CH₂– a 3078 cm^{-1} y 2934 cm^{-1} , respectivamente. La amida A está localizada a ~3270 cm^{-1} hasta ~3500 cm^{-1} y la amida B (vibración de estiramiento N–H) es una banda de intensidad débil en ~3030 cm^{-1} hasta ~3100 cm^{-1} , que son características de las proteínas (Barth et al., 2007). El SLPU presenta las bandas correspondientes a la amida I (C=O) y la amida II (N–H) en 1617 cm^{-1} y 1531 cm^{-1} . Además, el espectro FT-IR muestra las bandas características de la urea, las cuales son dos regiones en el espectro a 3269 cm^{-1} y 3201 cm^{-1} , donde la amina primaria presenta un desplazamiento de número de onda. Además, está presente un desplazamiento de las bandas de carbonilo para la urea de 61 cm^{-1} y para el SLP sin urea de 18 cm^{-1} . Esto indica que existe una fuerte interacción a través de puentes de hidrógeno entre los grupos amino de las proteínas y los grupos carbonilo de la urea, característica observada por Castro-Enríquez et al. (2012). Además, estas interacciones son llevadas a cabo por los grupos carbonilo del gluten de trigo y de los grupos amino de la urea. Las bandas FT-IR reportadas para el SLPU coincidieron con las bandas informadas por Castro-Enríquez et al. (2012) para gluten y urea, mientras que Robertson et al. (2014) reportó bandas de gluten de trigo que son consistentes con estos resultados. La SLPU después de la liberación de urea muestra cómo la amida I y la amida II regresaron a su posición original, y la muestra no presenta las dos regiones del espectro que son características de la amina primaria. Esto sugiere que la liberación se ha llevado a cabo y, por lo tanto, no hay presencia de urea en el material después de la liberación. Esta explicación es consistente con Castro-Enríquez et al. (2012), donde la amida I (C=O) y las bandas de amida primaria volvieron a su posición original después de la liberación de urea. Estos resultados se muestran en la Figura 8, donde se puede ver

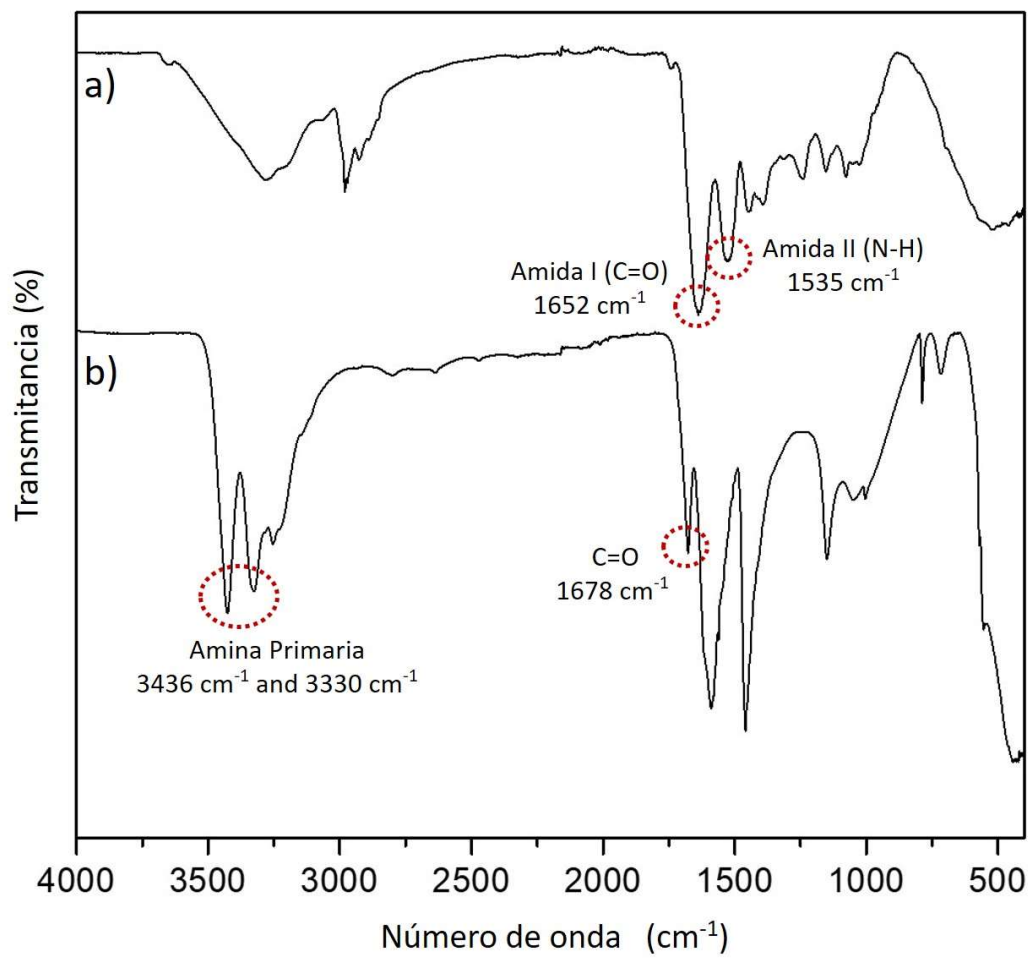


Figura 6. Espectro de FT-IR del gluten de trigo (a) y la urea (b).

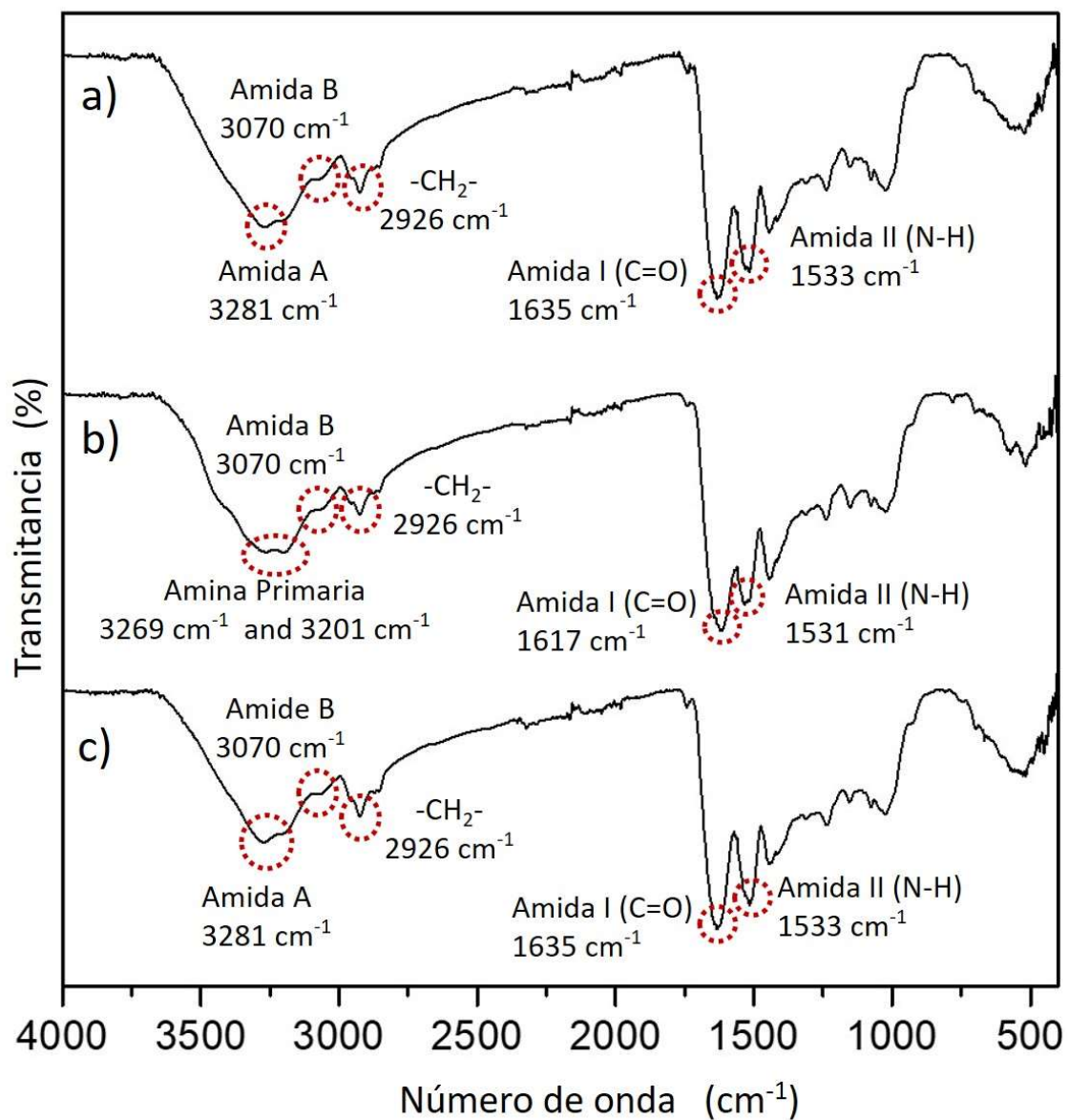


Figura 7. Espectro de FT-IR del SLP sin urea (a), SLPU (b) y el SLPU después de la liberación de urea (c).

en el espectro las posiciones originales de las bandas características de gluten de trigo y urea, que se desplazaron debido a las interacciones entre ellas.

Experimento de Liberación Prolongada de Urea

La Figura 9 muestra la cinética de liberación de urea, en la que se puede observar que durante los primeros 30 minutos, se libera el 63.83% de la urea. Durante la primera hora alcanza el 69.59% de la urea liberada, hasta que, el SLPU alcanza el equilibrio a las 8 h liberando el 97% del total de urea. Este comportamiento podría deberse a que, durante la primera h, el agua interactuó con la urea que estaba expuesta al exterior. La urea ubicada fuera de la pastilla se disolvió en agua, mientras que el resto del agua continuó entrando por los poros y canales de la pastilla. La urea presente en el exterior de los poros se disuelve y comienza el proceso de difusión gradualmente. El volumen y los diámetros de los poros presentes en la pastilla aumentan, lo que expande el espacio, por el cual la urea disuelta en agua se difunde hacia el exterior de la pastilla. Al mismo tiempo, se lleva a cabo el hinchamiento de la pastilla, es decir, el proceso de hinchamiento y la liberación de la urea se llevan a cabo simultáneamente, de acuerdo con lo reportado por Nandi y Winter con un material de hinchamiento industrial (Nandi & Winter, 2005). Por lo tanto, este sistema, al igual que otros compuestos por gluten de trigo, tiene una alta liberación en tiempos cortos, presentando una liberación prolongada y alcanza el equilibrio al librar más del 90%. Estos resultados indican que el SLPU tiene un comportamiento de liberación prolongada, lo que lo hace adecuado para su posible aplicación en cultivos agrícolas. Por otro lado, el experimento de liberación se realizó con agua, pero si la pastilla se aplica en cultivos agrícolas, el comportamiento podría ser más lento que el predicho en el experimento de liberación, debido a la diferencia de variables como la humedad, la temperatura, pH, actividad de enzimas y microorganismos, y textura del suelo (Morgan et al., 2009; Timilsena et al., 2015). En la actualidad, existen varios materiales desarrollados a partir del gluten de trigo que puedan ejercer una liberación de urea de manera prolongada y que puedan ser aplicados en campos agrícolas. Castro-Enríquez et

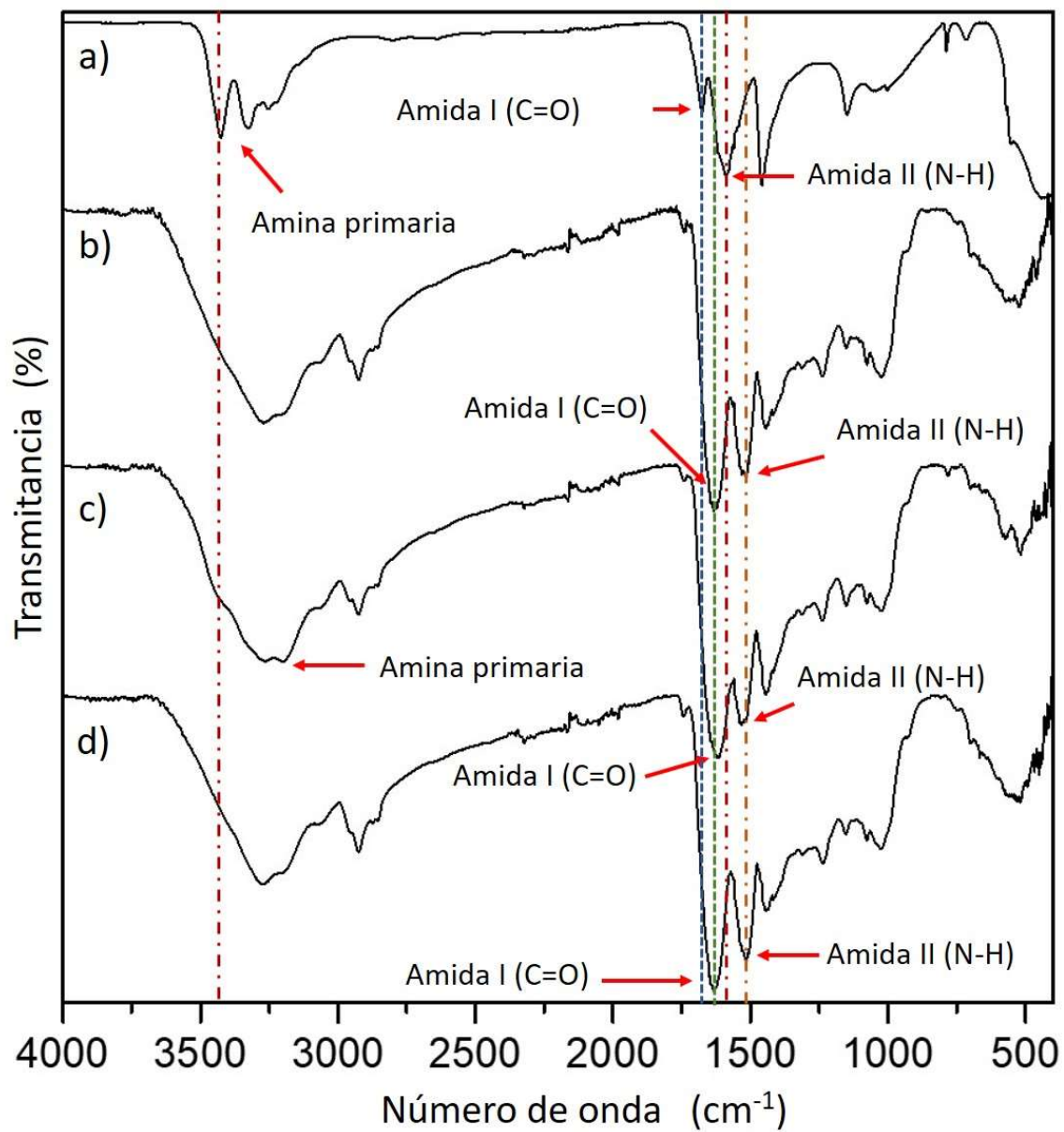


Figura 8. Espectro de FT-IR del movimiento de bandas de la urea (a), SLP sin urea (b), SLPU (c) y del SLPU después de la liberación (d).

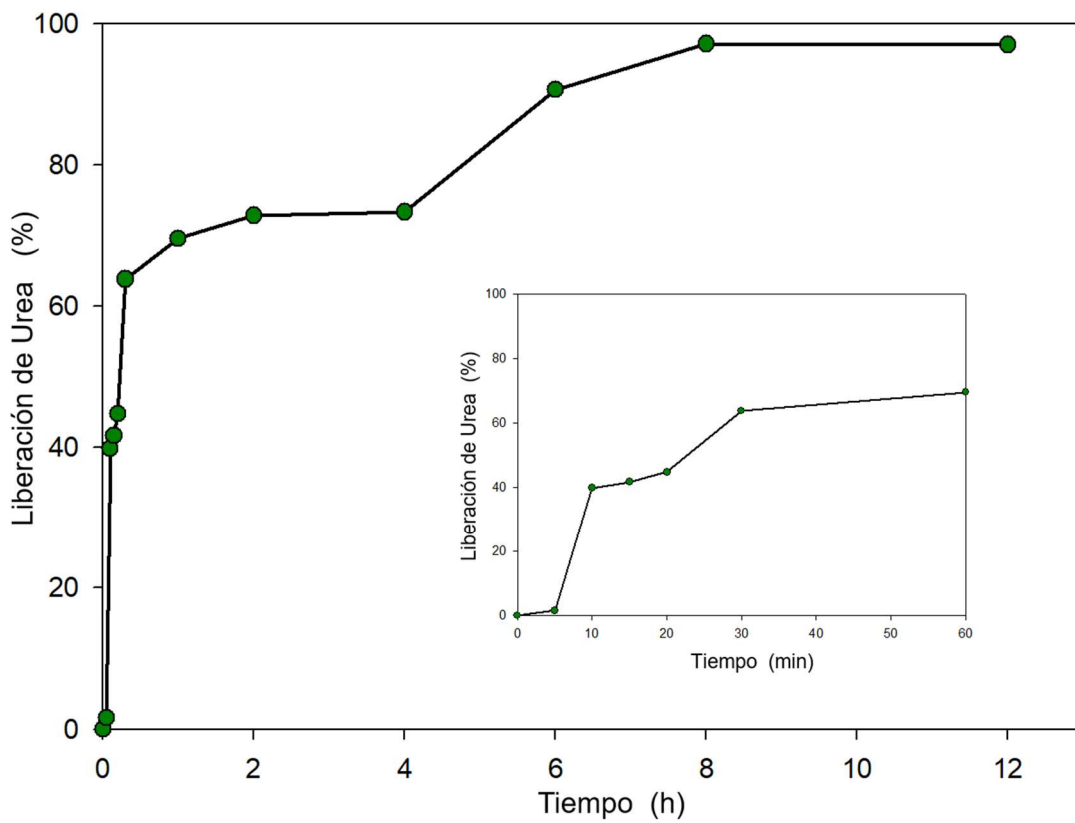


Figura 9. Cinética de liberación de urea en agua destilada a pH 7 y 25°C.

al. (2012) desarrollaron películas de gluten de trigo cargadas con urea, en las cuales se demostró la posible aplicación de este material en campos agrícolas, donde los estudios de liberación revelaron que el material posee un comportamiento de liberación prolongada. El equilibrio se alcanzó a los 300 minutos, logrando una liberación del 98% de la urea atrapada en las películas, lo que equivale a 55.49 mg. Barreras-Urbina et al. (2018) desarrollaron micropartículas a partir de proteínas de gluten de trigo solubles en etanol, donde los autores demostraron a través del estudio de liberación que las micropartículas pueden liberar 52.80 mg de urea alcanzando el equilibrio a los 720 minutos, mientras que, en este trabajo, el SLPU liberó el 97% en 480 minutos, que es equivalente a 58.20 mg de urea. Los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C en agua destilada (pH neutro). Estos resultados indican que el SLPU tiene un mejor rendimiento en comparación con las membranas y micropartículas mencionadas anteriormente. Esto puede estar relacionado con la cantidad de fracciones huecas y sus asimetrías en el SLPU. Además, el SLPU tiene la capacidad de absorber y retener agua, como se muestra en experimentos anteriores; así, esto podría influir en su liberación total en el equilibrio. Esto muestra que la combinación de gluten de trigo y urea podría aplicarse potencialmente como un sistema de liberación prolongada de urea. Tapia-Hernández et al. (2018) desarrollaron micropartículas porosas de gluten de trigo, que exhibían propiedades adecuadas, como su gran área superficial. Con esto último, los autores concluyeron que el material podría tener un alto potencial como sistema de liberación prolongada. Sin embargo, las técnicas como la nanoprecipitación, la emulsión-difusión y la técnica de electroaspersión utilizada para el desarrollo de micropartículas de gluten de trigo poroso presentan ciertas desventajas, como el uso de solventes, alto gasto de energía, bajos rendimientos y un alto tiempo de producción (Tapia-Hernández et al., 2015). Esto, convierte al material elaborado mediante estas técnicas como una opción no viable para su aplicación como alternativa en los campos agrícolas. Las pastillas de gluten de trigo podrían ser una mejor opción debido a su facilidad de producción, el corto tiempo de producción, el bajo costo de la materia prima y su disponibilidad, y el uso de bajas cantidades de agua como solvente. Además, Xiao et al. (2017) prepararon

polímeros superabsorbentes a base de almidón (SBSAP) para la liberación lenta de urea. Los autores determinaron la efectividad del sistema como un sistema de liberación lenta en agua. El sistema SBSAP liberó el 15% de la urea en la etapa inicial (0-5 días), mientras que, de 5 a 20 días, se liberó más del 50%. Además, de 20 a 40 días, el SBSAP liberó más del 80% de urea, con un 10% restante que aún podría estar en el sistema. A los 45 días de la liberación, el sistema se desintegró en fragmentos mucho más pequeños. Este estudio muestra que hay otros materiales capaces de tener urea con un comportamiento de liberación lenta y prolongada. Sin embargo, este tipo de proceso implica un mayor costo y dificultad en comparación con el proceso descrito aquí para hacer la pastilla, debido a la modificación química del almidón, el uso de agentes reticulantes, el uso de un sistema mezclador y reactor, el uso de varias temperaturas durante el proceso. Por otro lado, el estudio con SBSAP toma alrededor de 1 mes para lograr el equilibrio de liberación de urea. Ese podría ser un comportamiento no deseado si se aplicara en campos agrícolas. Debido a que el agua de riego está disponible solo una o dos veces al mes, dependiendo de las necesidades de los cultivos, la planta podría no adquirir la cantidad necesaria de nutrientes a través de un sistema como SBSAP. Por el contrario, un sistema como la pastilla de gluten de trigo, que libera urea en un tiempo más corto, con una humedad promedio más baja, podría satisfacer adecuadamente la cantidad de nutrientes que la planta necesita para su desarrollo. Además, el sistema de gluten de trigo-urea podría aplicarse como la urea convencional, es decir, a través del suelo agrícola.

Determinación de las condiciones de equilibrio del SLP sin urea

En la Figura 10 se muestran los puntos de equilibrios a distintas concentraciones. Cabe destacar que cada punto de equilibrio se obtuvo a partir de la medición de la concentración de urea en la solución. Cada punto equivale a 5 días de interacción entre la solución de urea y el SLP sin urea. Se observa que a bajas concentraciones no se sigue una tendencia marcada de isoterma, pero en cuanto a concentraciones medias y concentraciones más altas, se muestra una tendencia un poco difusa. Al eliminar datos erróneos y repetir los experimentos se obtiene una gráfica de

equilibrio más clara la cual se muestra en la Figura 11. Donde se observa la tendencia que se presentó al momento de obtener las condiciones de equilibrio del gluten de trigo en soluciones de urea a distintas concentraciones. Se realizaron varios ajustes de acuerdo con la ecuación $y = y_0 + ax^b$ y a la ecuación $y = ax^b$, en la cual la última ecuación obtuvo el mejor ajuste de acuerdo con su inicio más cercano a cero y la tendencia como una isoterma de Freundlich (Tipo III) en la cual el adsorbato (urea) es adsorbido en la superficie del adsorbente (SLP sin urea) en multicapas. De acuerdo con el ajuste realizado (Figura 12) utilizando el software SigmaPlot 10.0, se obtiene un valor de $b=1.87$ y una $R^2=0.96$, con lo que se observa que se muestra un comportamiento “desfavorable”. Esto quiere decir que, al obtener este comportamiento el adsorbato tiene poca capacidad de adsorberse en el adsorbente, por lo cual, el adsorbato tiene facilidad de desorberse fácilmente. Esto concuerda con los datos obtenidos por los espectros de FT-IR, en los cuales se observa la interacción entre la urea y la matriz de gluten de trigo a través de puentes de hidrógeno.

Modelación Matemática de Liberación de Urea

De acuerdo con los resultados anteriores, se puede explicar preliminarmente el desarrollo matemático de liberación de urea en el sistema de liberación prolongada. En la Figura 13 se muestra un esquema del proceso de liberación en laboratorio, en el cual se muestra el experimento de liberación. La urea al estar en contacto con el agua se liberará por diferencia de concentraciones en el medio, por lo que a cierto tiempo llegará a un equilibrio. Idealmente, la liberación debe de llegar a un equilibrio, mientras que durante el experimento se toman en cuenta ciertas consideraciones como; mezclado perfecto, volumen constante, temperatura constante, régimen no estacionario, porosidad uniforme, transporte unidireccional Z y equilibrio químico local (desorción de equilibrio).

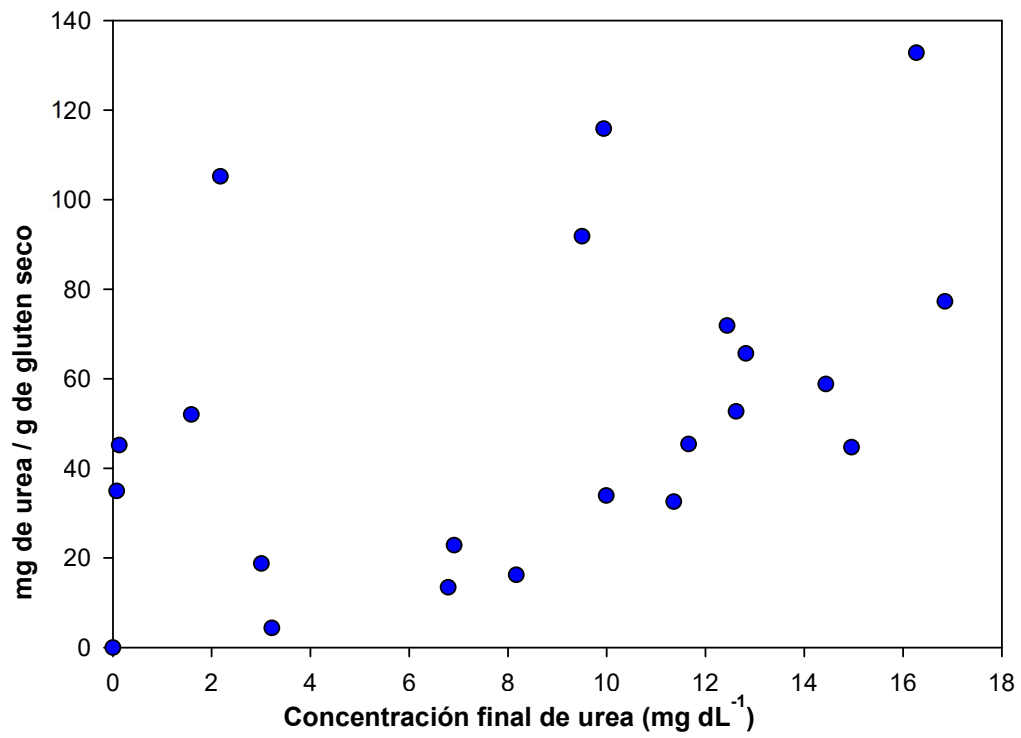


Figura 10. Isotherma de adsorción de urea en agua destilada a 25 °C.

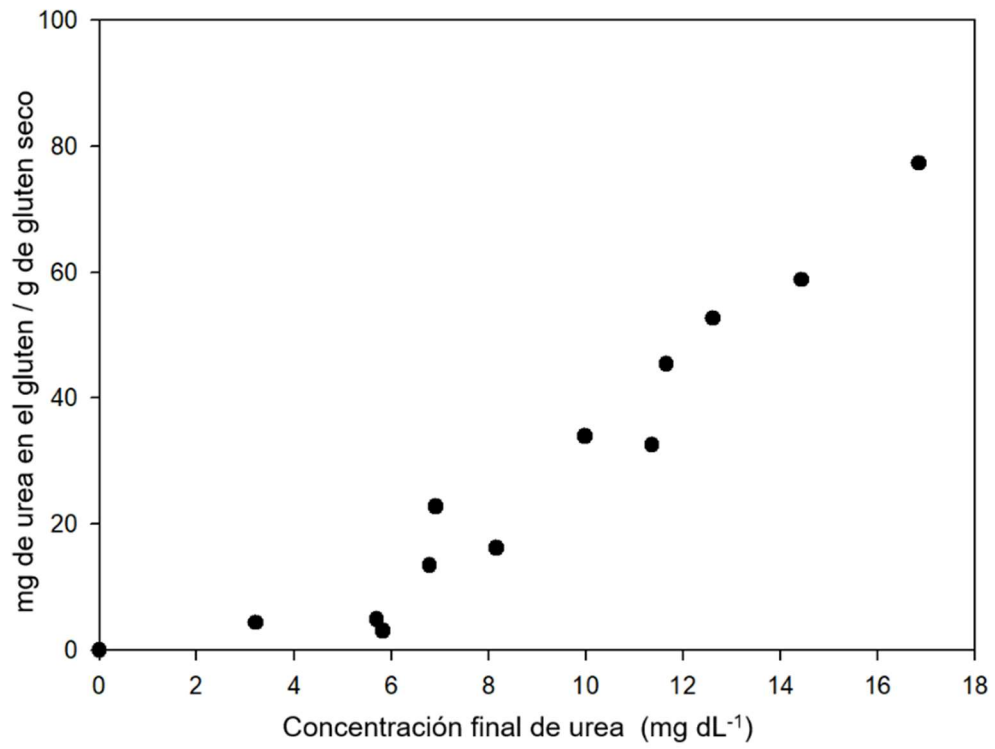


Figura 11. Isotherma de adsorción de urea de gluten seco en agua destilada a 25 °C.

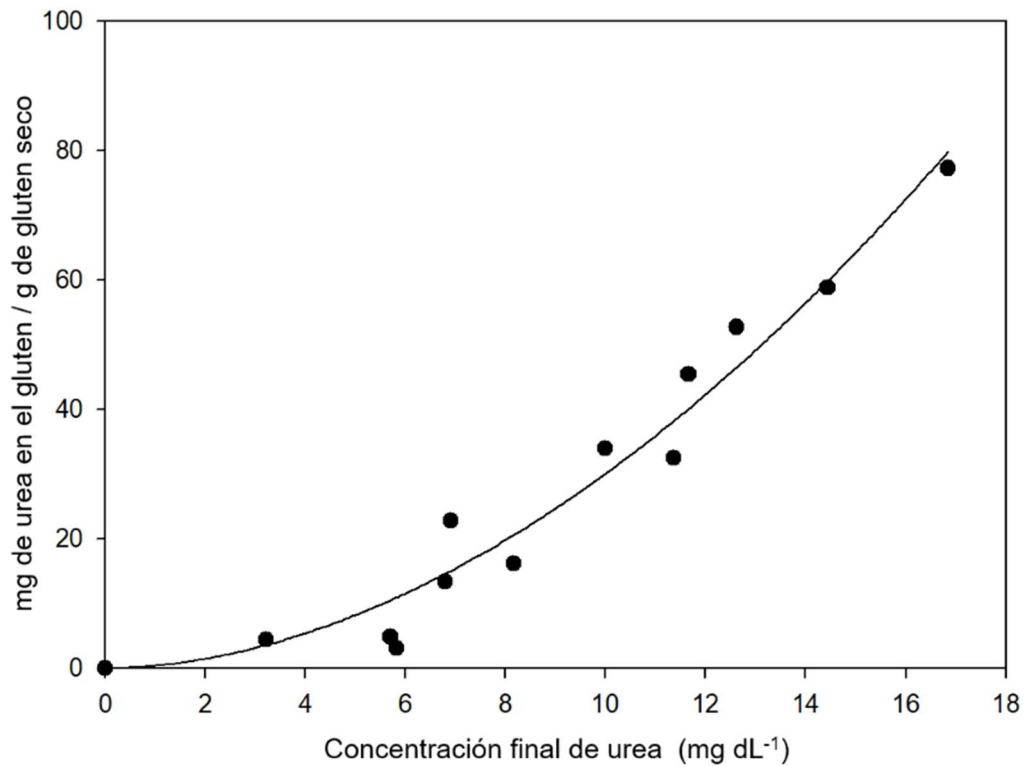


Figura 12. Isotherma de adsorción de urea de gluten seco en agua destilada a 25 °C ajustada a la ecuación de Freundlich.

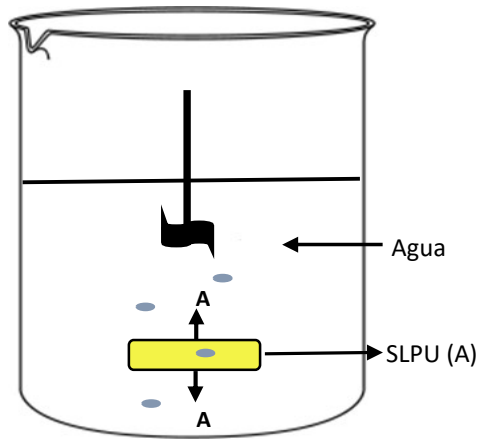


Figura 13. Esquema de liberación de urea en un sistema cerrado de agua destilada a 25 °C

Al tener estas suposiciones de la liberación, se puede partir de la ecuación de continuidad en términos de flujo con coordenadas cilíndricas (Ecuación 4) para simplificarla de acuerdo con los resultados anteriores. Es decir, tomando en cuenta el diámetro y el espesor, se realizaron modificaciones para obtener el coeficiente de difusión efectivo, el cual está dado de acuerdo con la facilidad que tiene la urea moverse dentro del sólido hacia el exterior. De acuerdo con la geometría y la ecuación inicial, se optó por modelar la liberación de urea desde una pastilla, la cual obliga a la liberación de manera axial, evitando la liberación radial. Esto con el objetivo de modelar de manera unidireccional, debido a que el coeficiente de difusión efectivo sería el mismo, fuera en una dirección o en tres.

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} + \left[\frac{1}{r} \frac{\partial (rN_{Ar})}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial N_{A\theta}}{\partial \theta} + \frac{\partial N_{Az}}{\partial z} \right] = R_A \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

$\frac{\partial C_A}{\partial t}$ = Concentración de nutriente con respecto al tiempo

$\frac{1}{r} \frac{\partial (rN_{Ar})}{\partial r}$ = Difusión en dirección radial

$\frac{1}{r} \frac{\partial N_{A\theta}}{\partial \theta}$ = Difusión en dirección angular

$\frac{\partial N_{Az}}{\partial z}$ = Difusión en el eje Z

N_A = Moles de urea por unidad de área

R_A = Rx homogénea

Simplificando la Ecuación 4 de acuerdo con los resultados anteriores, se tiene la ecuación siguiente, la cual propone un modelo de transporte de masa unidireccional en el eje Z.

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{Aef} \frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} - \frac{\rho}{\varepsilon} \left(\frac{\partial q_A}{\partial t} \right) \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

$\frac{\partial C_A}{\partial t}$ = Acumulación de urea en la solución con respecto al tiempo

$D_{Aef} \frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2}$ = Difusividad efectiva de urea en el sólido (Entrada de A – Salida de A)

$\frac{\rho}{\varepsilon} \left(\frac{\partial q_A}{\partial t} \right)$ = Rapidez de desorción

Con la Ecuación 6 se propone un transporte de masa unidireccional en el eje Z. Por otra parte, el coeficiente de difusión efectiva para el SLPU con bloqueo de los ejes multidireccionales y el coeficiente de difusión efectiva para el SLPU con liberación solo en el eje Z fueron de $D = 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$ con una $R^2 = 0.82$ y de $D = 2.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$ con una $R^2 = 0.78$, respectivamente (Figura 14 y Figura 15). Lo cual indica, en comparación con estudios de sistemas de liberación prolongada de fertilizantes, que los coeficientes obtenidos en el SLPU ya sean con bloque y sin bloque de los ejes siguen siendo más lentos que los que se encuentran de manera comercial tal es el caso de la urea recubierta comercial marca Agrium que cuenta con un coeficiente de difusión efectiva de $1.6 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ donde al extrapolar los valores del SLPU corresponderían a $1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min} = 1.6 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ y $2.1 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{min} = 3.5 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Estos valores indicarían un desplazamiento de la urea a través del SLPU de manera más lenta que lo comercial, lo cual, indicaría una posible aplicación en campo agrícola de manera prolongada. Los coeficientes de difusividad efectiva de la urea reportados en la literatura concuerdan de manera correcta con el resultado obtenido en esta investigación, siendo los coeficientes de la urea en agua más rápidos ($1.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} = 1.2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ y $1.18 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$) que los coeficientes reportados en este trabajo para el SLPU (Trinh et al., 2014).

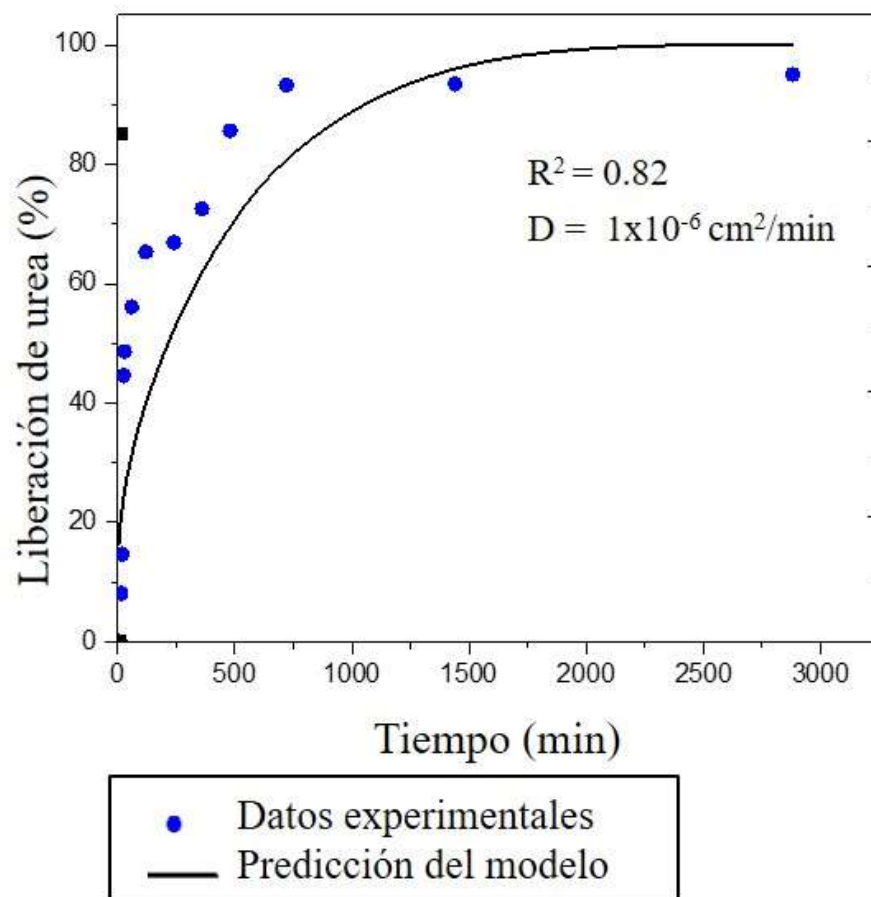


Figura 14. Porcentaje de liberación experimental y calculada de urea de las pastillas con bloqueo.

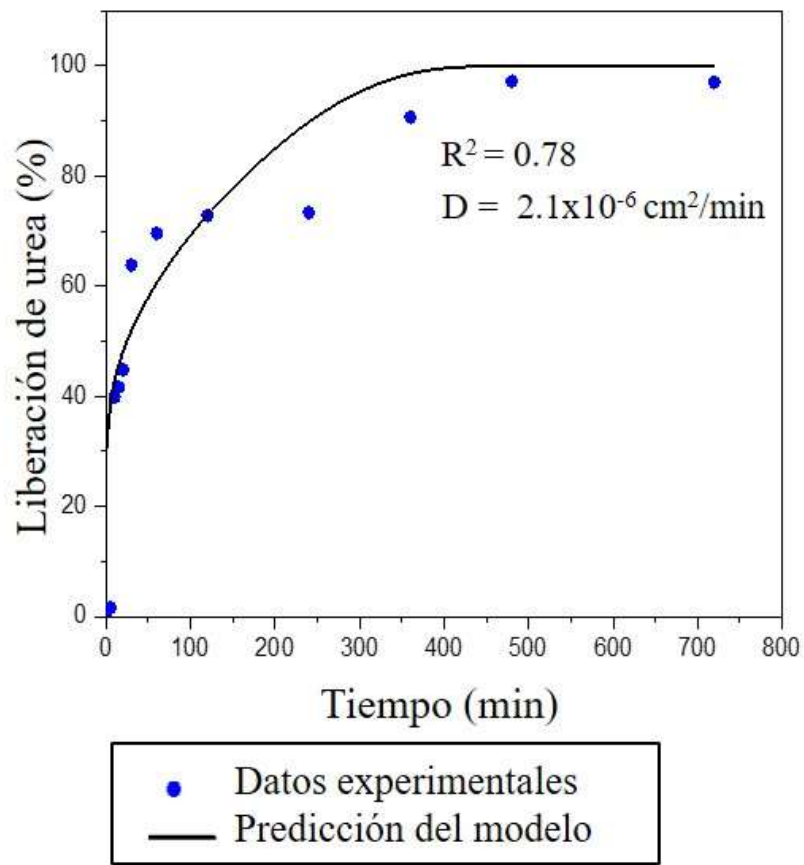


Figura 15. Porcentaje de liberación experimental y calculada de urea de las pastillas sin bloqueo.

Propiedades fisicoquímicas de los suelos agrícolas

La Tabla 2 presenta las propiedades fisicoquímicas de los suelos antes de la aplicación de cada tratamiento: 0 kg N ha⁻¹, 150 kg de N ha⁻¹ y SLPU. Tanto los suelos DAGUS como los VE presentaron diferentes texturas, que se podrían clasificar según el diagrama de texturas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) como textura franca para el suelo DAGUS y textura franco-areno-arcillosa para el suelo VE. El suelo con la textura franco-arenosa-arcillosa muestra alto contenido de nitrato (NO₃⁻), probablemente debido a las actividades ganaderas y los experimentos de cultivos en los campos. Las propiedades fisicoquímicas de ambos suelos pueden considerarse características adecuadas para el desarrollo del cultivo. La Tabla 3 muestra las propiedades fisicoquímicas después de cada tratamiento de fertilización, donde el suelo VE no cambia su textura debido a un efecto de los tratamientos, manteniendo su textura franco-arenosa-arcillosa. El tratamiento con SLPU muestra un alto contenido de NO₃⁻ en comparación con el del tratamiento de 150 kg de N ha⁻¹, con las características presentes en las texturas de ambos suelos. En ambas situaciones, este comportamiento podría deberse al SLPU. Es probable que, durante el riego, el suelo se lavara y los nitratos perdidos fueran aquellos que ya estaban contenidos en el suelo en su forma natural. Sin embargo, el alto contenido de NO₃⁻ en los tratamientos del SLPU muestra el comportamiento de liberación prolongada de urea, es decir, la urea liberada se transformó a través del proceso biogeoquímico en NO₃⁻, que son detectables después de la aplicación del SLPU, esta última, posiblemente una condición adecuada debido a el enriquecimiento del suelo agrícola. Además del aporte de nitrógeno, el SLPU aportó materia orgánica. Sin embargo, la materia orgánica en estos resultados no exhibe diferencias: es decir, el tratamiento con urea presentó materia orgánica similar al tratamiento con SLPU. Esta medición característica podría aumentar en su cuantificación si el SLPU se hubiera degradado por completo, mientras que en el tratamiento con urea no se puede aumentar la materia orgánica debido a que no posee el material necesario como el SLPU. Esto indica que el SLPU puede aplicarse en cultivos que impliquen de 5 a 6 meses de tiempo de crecimiento.

Tabla 2. Características fisicoquímicas iniciales del suelo proveniente del VE y DAGUS bajo diferentes tratamientos de fertilización

Parámetr	VE	DAGUS
o		
pH	7.06	7.29
Materia orgánica (%)	0.54	0.67
Arcilla (%)	29.00	23.00
Limo (%)	26.00	32.00
Arena (%)	45.00	45.00
NO ₃ ⁻ (ppm)	155.00	258.54
K (ppm)	105.00	96.00
Ca (ppm)	2,690.00	2,950.00
Mg (ppm)	280.00	220.00
S (ppm)	20.00	17.00
Fe (ppm)	1.80	1.70
Cu (ppm)	1.60	1.40
Zn (ppm)	2.20	1.30
Mn (ppm)	1.20	1.10
Na (ppm)	570.00	189.00

VE: Valle de Empalme, **DAGUS:** Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.

El SLPU podría mantener y aumentar la materia orgánica del suelo, principalmente proporcionando componentes como C y N, independientemente del cultivo desarrollado y los riegos aplicados. Con estas características, el SLPU proporcionaría, después de la cosecha, los componentes necesarios (de las proteínas de gluten de trigo) para beneficiar el suelo agrícola antes de la siembra de cualquier cultivo. Durante la aplicación de nitrógeno a largo plazo en los campos agrícolas, se promueve la acidificación de los suelos, lo que afecta la degradación del suelo, la fertilidad y la productividad. Además, estos cambios tienen un efecto sobre la actividad microbiana que se ve afectada por los cambios de pH (Dai et al. 2018). Sin embargo, en este estudio, aunque hay un alto contenido de nitratos después de la aplicación de la SLPU, este último no presenta acidificación del suelo, manteniendo el pH en alrededor de 7, el cual es óptimo para la actividad microbiana y el desarrollo de cereales como el trigo.

Pérdidas de nitrógeno

La medición de los valores de NO_2^- mostró resultados con valores poco confiables. Se ha reportado que la oxidación de NO_2^- en NO_3^- por la acción de *Nitrobacter* se lleva a cabo rápidamente. Por lo tanto, una acumulación de nitritos en suelos agrícolas no es común (Cameron et al. 2013). La Figura 16a muestra las pérdidas de NO_3^- y NH_4^+ durante el primer riego para los tres tratamientos en ambas texturas del suelo (DAGUS y VE). Ambos suelos presentan diferencias significativas entre cada tratamiento, lo que es debido a los tamaños de partícula, los cuales, son diferentes en la composición de cada textura de suelo. Los lixiviados de nitratos obtenidos para todos los tratamientos del suelo DAGUS presentaron valores más bajos en comparación con los del suelo VE debido a la variación en el tamaño de las partículas. Estas características tienen efecto en la filtración de agua y en el arrastre de nitratos, es decir, la diferencia en el tamaño las partículas dan lugar a los espacios entre ellas mismas; así, a cierta profundidad, el lixiviado avanza más rápidamente. Las cantidades de lixiviado para tratamientos de 150 kg N ha^{-1} demostraron un alto valor en comparación con los tratamientos de SLPU. Debido a que la urea aplicada de manera convencional está en contacto directo con el agua,

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los suelos agrícolas después de la aplicación de los tratamientos de fertilización.

Parámetro	Suelo del VE			Suelo del DAGUS		
	0 kg N ha ⁻¹	150 kg N ha ⁻¹	SLPU	0 kg N ha ⁻¹	150 kg N ha ⁻¹	SLPU
Materia Orgánica (%)	1.07	1.07	1.00	0.40	0.74	0.67
pH	7.45	7.17	7.31	7.30	6.84	7.17
Arcilla (%)	25.00	23.00	23.00	19.00	19.00	19.00
Limo (%)	16.00	18.00	16.00	26.00	30.00	28.00
Arena (%)	59.00	59.00	61.00	55.00	51.00	53.00
NO ₃ ⁻ (ppm)	31.62	32.24	251.10	33.48	37.82	265.98
K (ppm)	119.00	124.00	127.00	122.00	107.00	104.00
Ca (ppm)	2180.00	2370.00	2070.00	2590.00	2500.00	2430.00
Mg (ppm)	230.00	240.00	210.00	220.00	210.00	210.00
S (ppm)	17.00	17.00	19.00	16.00	16.00	21.00
Fe (ppm)	2.30	1.50	2.20	2.20	2.00	3.80
Cu (ppm)	2.80	2.00	2.40	2.30	2.00	2.20
Zn (ppm)	0.90	0.70	0.60	0.60	0.90	1.20
Mn (ppm)	1.80	1.40	3.00	2.20	1.80	2.50
Na (ppm)	347.00	361.00	327.00	152.00	139.00	133.00

VE: Valle de Empalme, **DAGUS:** Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.

sus propiedades de solubilidad provocan una rápida disolución a través del suelo, mientras que el SLPU presentó una barrera polimérica conferida por las proteínas de gluten de trigo que evitó la rápida disolución de la urea en agua. Con esto, la urea disminuye su transporte a través del sistema para llegar al exterior del SLPU y, además, no está completamente disponible para su uso en el proceso biogeoquímico del nitrógeno en el suelo. Con base en estos resultados, la eficiencia del SLPU para reducir las pérdidas de nitratos durante el primer riego fue del 73.75% para el suelo VE, mientras que para el amonio fue del 63.33%. La eficiencia de SLPU para nitratos en el suelo DAGUS fue del 84.02%, mientras que para el amonio fue del 24.91%. La Figura 16b presenta las pérdidas de nitratos y amonio a través de lixiviación durante el segundo riego para ambos suelos. Se puede observar que, para tratamientos de 0 kg N ha⁻¹, existen diferencias significativas en las pérdidas de nitratos y amonio por el efecto de textura del suelo. El tratamiento con 150 kg de N ha⁻¹ no presentó diferencias significativas en la lixiviación de nitratos entre ambos suelos; sin embargo, en comparación con el primer riego, el suelo DAGUS presentó un aumento en la cantidad de nitratos. Esto puede deberse a la oxidación de nitritos en nitratos por la actividad microbiana y también a las condiciones ambientales; es decir, el nitrógeno es un elemento que se puede fijar desde la atmósfera. Además, la textura del suelo DAGUS favorece una mayor retención de nutrientes y agua debido a que su estructura es heterogénea en comparación con el suelo VE. El amonio lixiviado mostró diferencias significativas debido al efecto de la textura del suelo agrícola. El tratamiento del SLPU reveló diferencias significativas debido a la textura del suelo, en el cual se puede observar que el valor de lixiviado es menor que el del tratamiento de 150 kg de N ha⁻¹, debido al efecto de liberación prolongada que presenta el sistema. Este efecto es causado por la matriz polimérica en la que quedan atrapadas las moléculas de urea y por las interacciones de urea a través de los puentes de hidrógeno con los grupos reactivos de las proteínas del gluten de trigo (Castro-Enríquez et al., 2012; Barreras-Urbina et al., 2018). Con base en los resultados actuales, se puede deducir que la efectividad de la SLPU para los nitratos durante el segundo riego para el suelo del VE fue del 46,23%, mientras que para el amonio fue del 100%.

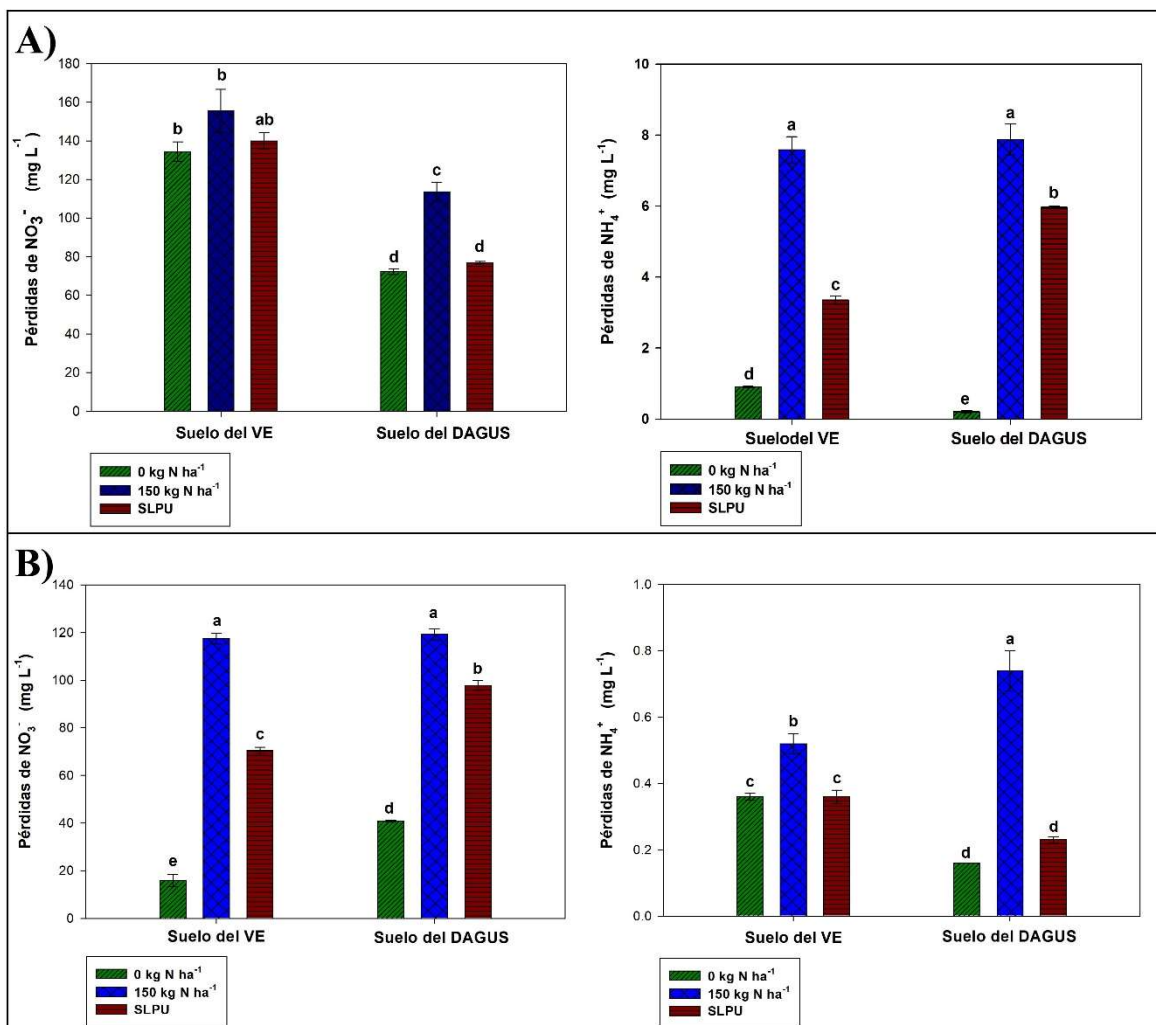


Figura 16. Pérdidas de nitratos y amonio durante el primer riego de auxilio (A) y el segundo riego de auxilio (B).

La eficiencia de SLPU de los nitratos para el suelo DAGUS fue del 27,32%, mientras que para el amonio fue del 87,94%. Los resultados indican que SLPU presentó una menor cantidad de amonio, y el valor de nitratos fue mayor para ambos suelos. Además, el pH de los suelos se mantuvo cerca de 7 (Tablas 1 y 2) para que se producirá el proceso de nitrificación, lo que provocó una menor cantidad de amonio en el suelo y, con esto, una mayor cantidad de nitratos. Cuando el contenido de amonio era bajo, la actividad microbiana relacionada con la nitrificación no se ve afectada. Sin embargo, cuando hay grandes cantidades de amonio en el suelo, hay un cambio en el pH y la actividad microbiana, como la de *Nitrobacter*, se ve afectada, una explicación reportada en la literatura científica que ayuda a corroborar lo que se encuentra en este estudio (Cameron et al. 2013). Gao y col. (2015) aplicaron un sistema de liberación controlada de urea en cultivos de papa. Donde los autores obtuvieron una eficiencia de uso de nitrógeno (NUE) de 87.8-169.4% y 108.3-226.4%, utilizando sistemas de urea recubierta poliméricamente (PCU) y urea recubierta con azufre y polímeros (PSCU). Sin embargo, los autores no especifican la reducción de pérdidas en un experimento sin plantas para determinar la eficiencia del sistema en términos de reducción de pérdidas. En este estudio, antes de aplicarlo a las plantas, decidimos usar un experimento de lixiviación para determinar, sin ninguna otra variable, la capacidad del sistema para reducir las pérdidas en comparación con el tratamiento con urea. Estos resultados indicaron que el sistema tiene la capacidad de reducir las pérdidas de N. De acuerdo con Shibata et al. (2017), el término eficiencia de uso de nitrógeno (NUE) puede aplicarse a las prácticas agrícolas, incluida la forma de fertilización. El sistema aplicado en esta investigación puede mejorar la NUE enfocada en la reducción de las pérdidas de nitrógeno. Es importante tener en cuenta que el SLPU se aplicó solo una vez durante el experimento. Esta es una ventaja en comparación con las prácticas convencionales de fertilización. Teniendo en cuenta que SLPU es un fertilizante de liberación prolongada, es deseable que proporcione las necesidades nutricionales a la planta en una sola aplicación durante el ciclo de crecimiento de la planta (Azeem et al. 2014). La Figura 17 presenta una descripción esquemática de las pérdidas de N durante el primer y segundo riego; Además, se proporciona el

ciclo del nitrógeno para comprender la transformación en forma de N a partir de la aplicación de urea en los suelos.

Análisis microbiológico

Las Figuras 18A) y 18B) muestran las comunidades microbianas en los suelos del VE y del DAGUS. Se observaron diversas comunidades microbianas con colonias de hongos y bacterias antes y después de los tratamientos. Esto puede deberse a los suelos del noroeste de México, que son de tierras áridas y que este tipo de microorganismos son característicos, considerando que las muestras provenían de suelos agrícolas. Los bajos niveles de humedad en el suelo, causados por las altas temperaturas durante la mayor parte del año, promueven el crecimiento de hongos, principalmente. Sin embargo, se puede observar el desarrollo de colonias transparentes, convexas y planas en ambos suelos. La figura 17C) muestra las colonias aisladas descritas, que son similares para ambos suelos, presentando una combinación de bacilos negativos y positivos a través de la tinción de Gram. El agar Ashby-Manitol se considera un medio de cultivo específico para *Azotobacter spp.*, que se clasifica como promotor del crecimiento de las plantas. Esto se debe a que promueve la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales y la producción de fitohormonas (Bandopadhyay y Das 2017). El crecimiento de una cepa con características similares en ambos suelos es razonable porque los suelos se derivan de suelos agrícolas de la misma región y se utilizan para el desarrollo de cultivos. Las UFC/g.s.s. para el suelo VE fue de 11,500 UFC/g.s.s. inicialmente y, después de la aplicación del SLPU, aumentó a 100,000 UFC/g.s.s., mientras que el suelo DAGUS fue inicialmente de 6,800 UFC/g.s.s. y, después de la aplicación del sistema, aumentó a 60,000 UFC/g.s.s. La variación de las comunidades microbianas se produce por el efecto del SLPU, y se obtuvo en función del aumento de las UFC/g.s.s. Estos resultados sugieren que, mientras el SLPU está en suelo agrícola, microorganismos como *Nitrobacter spp.* y *Azotobacter spp.*, entre otros, pueden estar aprovechando la materia orgánica, principalmente gluten de trigo, para aumentar su población, interviniendo a su vez en el proceso de nitrificación. Los resultados discutidos de las pérdidas de nitrógeno, son consistentes con el

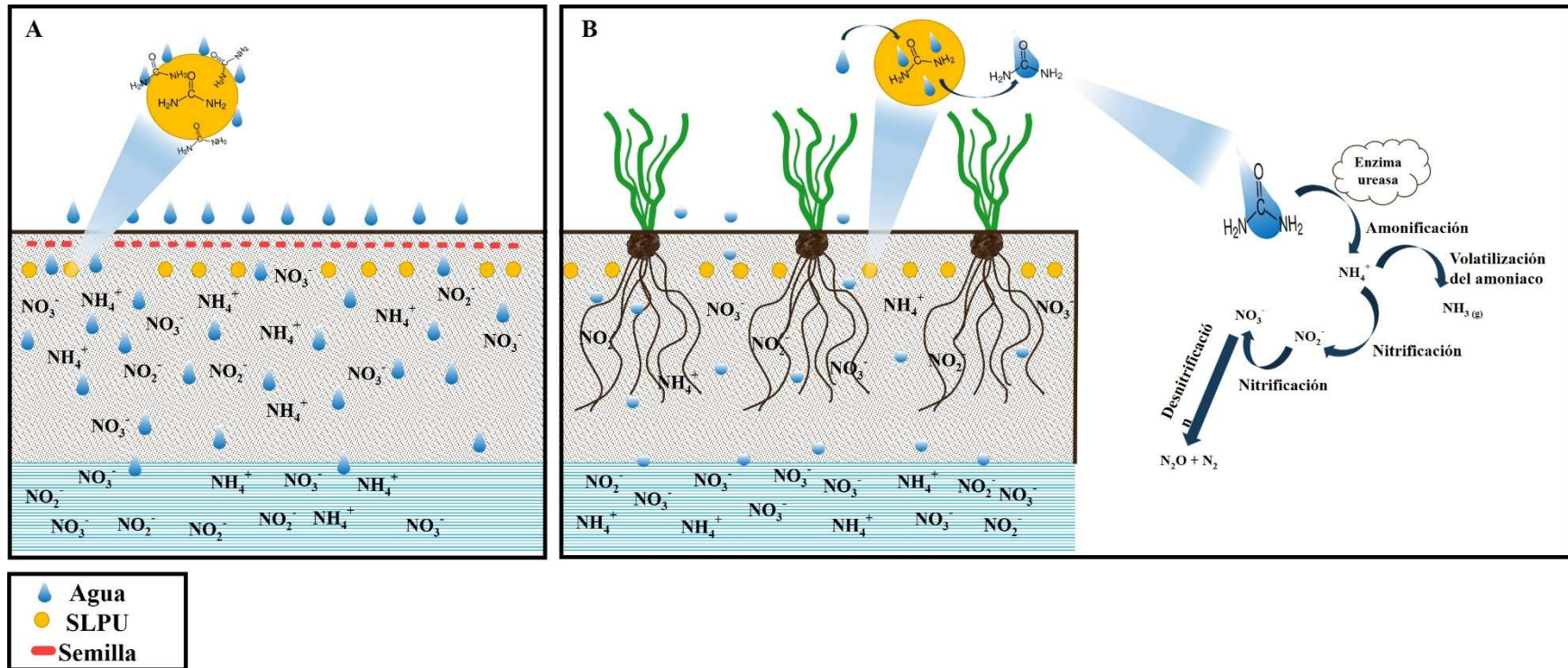


Figura 17. Descripción esquemática de la aplicación del SLPU; A) Primer riego de auxilio y pérdida de nutrientes y B) segundo riego de auxilio, pérdida de nutrientes y ciclo del nitrógeno

aumento de la población microbiana, considerando que las poblaciones de *Nitrobacter* y *Azotobacter* aumentaron. El primero se evidenció por el alto contenido de nitratos encontrados después de la aplicación, y el segundo, por su crecimiento en un medio de cultivo específico y sus características. El SLPU, basado en gluten de trigo y la urea, el cual fue aplicado en el suelo agrícola, puede aumentar las comunidades microbianas y afectar el proceso biogeoquímico del nitrógeno y formar metabolitos, ayudando así al crecimiento de microorganismos y a la nutrición de las plantas. Estas pruebas exhiben el efecto del SLPU en las comunidades microbianas, es decir, un factor importante en el crecimiento de las plantas.

Microscopía de Fluorescencia

Las Figuras 19A1 y 19A2 muestran las imágenes fluorescentes del SLP sin urea. Se pueden observar grupos de microorganismos en la superficie del sistema. Las imágenes muestran una estructura porosa, mientras que en las Figuras 18B1 y 18B2, podemos observar los poros con un diámetro aumentado y se observan grupos de microorganismos viables alrededor de los poros. Estas características podrían tener las características orgánicas del sistema debido a su composición. Los poros de la estructura facilitan la entrada de agua en el sistema, y los microorganismos aprovechan los espacios vacíos para crear nichos adecuados para su proceso de crecimiento. Además, se ha reportado que varios microorganismos promotores del crecimiento de las plantas requieren crecimiento en condiciones aeróbicas (Kennedy et al. 2015). Además, las ventajas del aumento de este tipo de microorganismos radican en la producción de varios tipos de enzimas nitrogenasas, que ayudan a la fijación del nitrógeno, y con esto, la producción de fitohormonas y compuestos necesarios para promover el crecimiento de las plantas (Setubal et al. 2009). El efecto del SLPU en las comunidades microbianas puede beneficiar las interacciones entre la planta y los microorganismos. Este efecto proporciona una nutrición adecuada para la planta mediante la interacción en las micorrizas, lo que podría ayudar a la fijación de

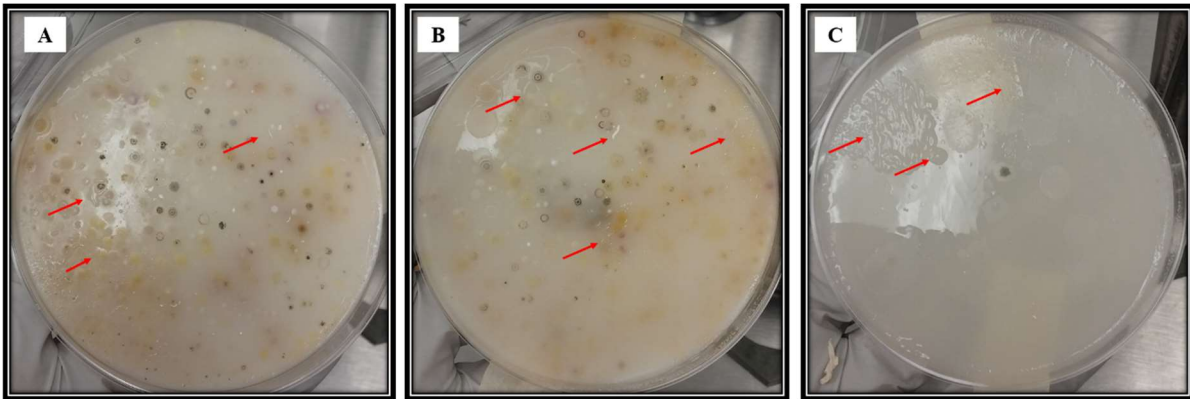


Figura 18. Crecimiento de las comunidades microbianas en Agar Ashby-Manitol; A) suelo del VE, B) suelo del DAGUS y C) colonias similares a partir de ambos suelos. Las flechas rojas indican las colonias.

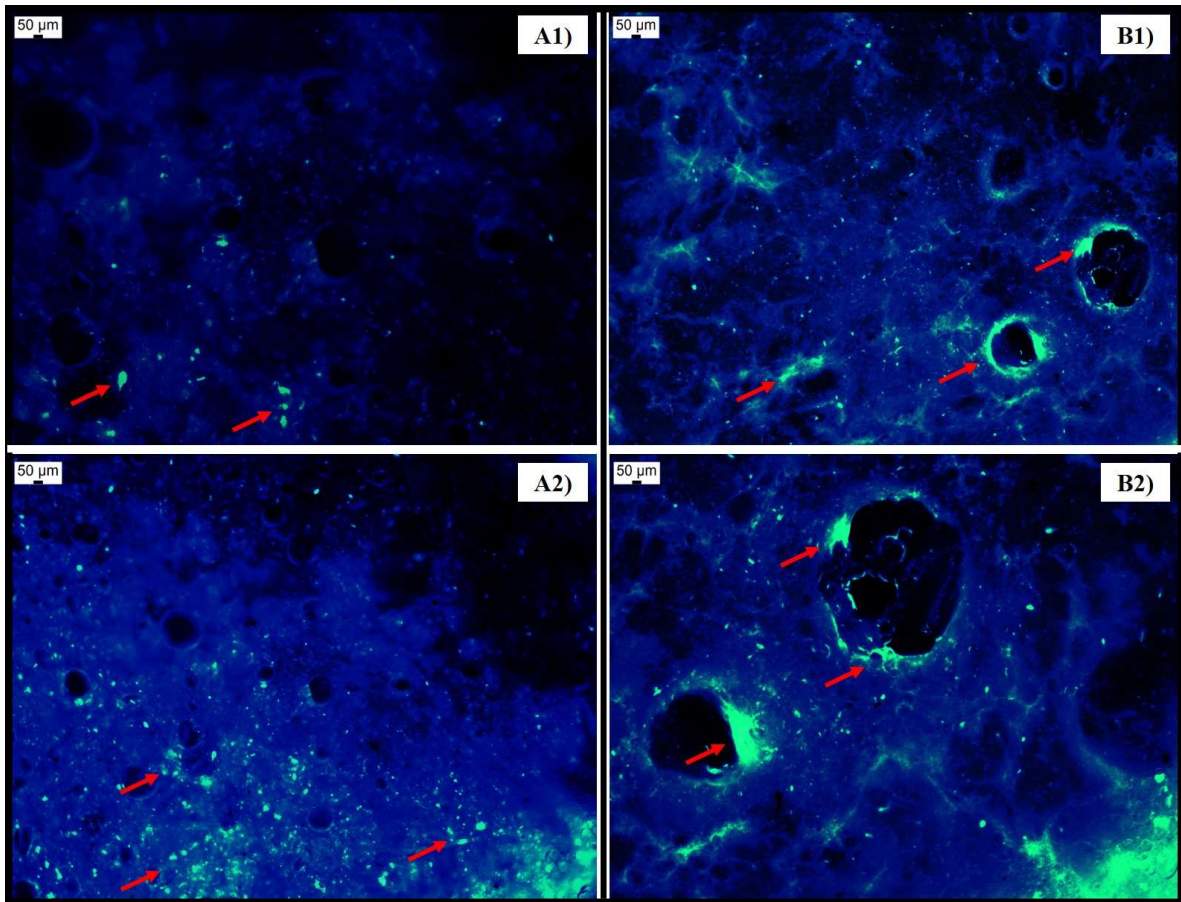


Figura 19. Imágenes de fluorescencia usando una magnificación de 10X con tinción DAPI; A1) y A2) SLP sin urea y B1) y B2) SLPU. Flechas rojas indican la viabilidad de los microorganismos.

nutrientes que no son fácilmente asimilables por la planta, y también facilita la nutrición correcta de N de fuentes orgánicas (Kuzyakov y Xu 2013). Zeng y col. (2016) reportaron que la fertilización nitrogenada afecta la diversidad bacteriana del suelo debido al enriquecimiento del suelo con N, lo que conduce a la acidificación del suelo. Esto provoca un cambio en el pH del suelo, lo que dificulta el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, en este trabajo de investigación, podemos observar el aumento de microorganismos fijadores de nitrógeno y promotores del crecimiento de las plantas, monitoreados por medio de un medio de cultivo específico. Al mismo tiempo, observamos que SLPU favorece su crecimiento y la cantidad de materia orgánica. Por lo tanto, podríamos suponer que el SLPU, de acuerdo con nuestros resultados, podría ser beneficioso para el suelo agrícola, la fijación de nitrógeno y la relación microorganismo-planta.

Degradación del SLPU en condiciones ambientales

La Figura 20 muestra el SLPU después de la aplicación en ambos suelos (VE y DAGUS). Las Figuras 20A1 y 20A2 presentan las imágenes del sistema mezclado con suelo agrícola, donde se puede observar que parte del sistema estaba intacto después del período de prueba. Las figuras 20B1 y 20B2 muestran el mismo efecto: el sistema demostró su capacidad para resistir la biodegradabilidad del medio ambiente, es decir, no se vio completamente afectado por las condiciones ambientales del suelo. La degradabilidad del material podría estar influenciada por varios factores, como la humedad del suelo, la temperatura, pero principalmente sus actividades biológicas (Zhou et al. 2015).

Estos resultados nos indicaron que SLPU posee la capacidad de resistir las condiciones ambientales del suelo agrícola del noroeste de México. También podríamos deducir que el SLPU podría proporcionar materia orgánica, y tal vez podría mantener la liberación de urea hasta la degradación completa del material.

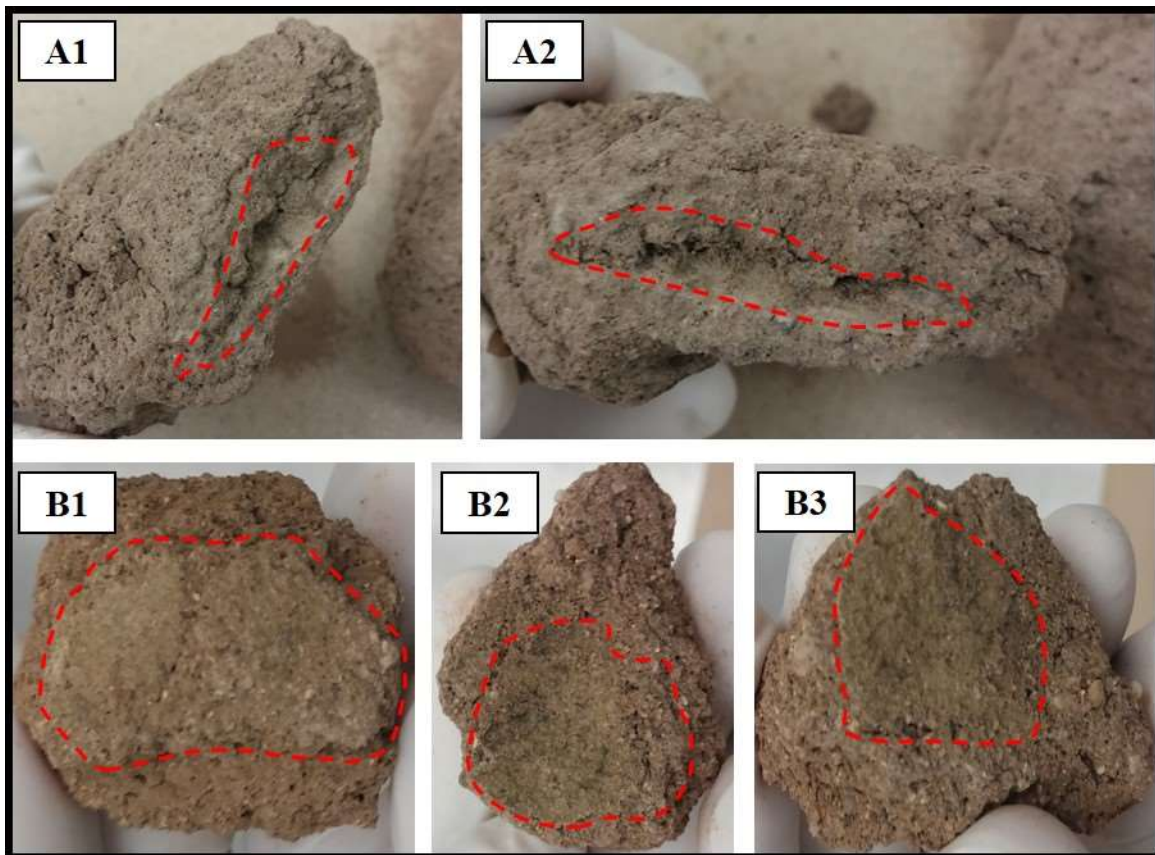


Figura 20. Imágenes del SLPU donde se marca con líneas rojas la zona restante del SLPU después de su aplicación en ambos suelos; DAGUS (A1 y A2) y VE (B1, B2 y B3).

Análisis de Calidad de la Planta de Trigo

En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de nacencia, macollaje (hijuelos) y número de plantas desarrolladas. El porcentaje de nacencia no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos, esto debido probablemente a situaciones ambientales del experimento. El macollaje no presentó diferencias significativas del tratamiento con 0 kg de N ha⁻¹ y la fertilización convencional de 150 kg de N ha⁻¹, pero si mostró diferencias significativas con el tratamiento de SLPU. Este aumento en el macollaje (Figura 21) por efecto del SLPU pudo deberse a la proporción de urea transformada en amonio o nitratos, la cual pudo haber sido absorbida por la planta, ya que, durante las primeras etapas de crecimiento del trigo, es necesario una buena nutrición en base a nitrógeno para el desarrollo correcto de fitohormonas que ayuden al crecimiento y desarrollo de la planta en sus etapas tempranas. El número de plantas fue distinto para los tres tratamientos y si mostró diferencias significativas entre los tres, esto probablemente a cuestiones medio ambientales.

Tabla 4. Porcentaje de nacencia, número de macollos y número de plantas de trigo a diferentes tratamientos de fertilización

Tratamiento	Nacencia (%)	Número de macollos	Número de plantas
0 kg de N	89.64±2.73 ^a	4.50±0.75 ^a	627±50 ^a
150 kg de N	80.71±4.85 ^a	4.73±0.49 ^a	586.50±3.54 ^b
SLPU	82.14±13.34 ^a	6.47±1.31 ^b	557±35.36 ^c

Letras distintas significan diferencias significativas entre los tratamientos por columna ($p < 0.05$)

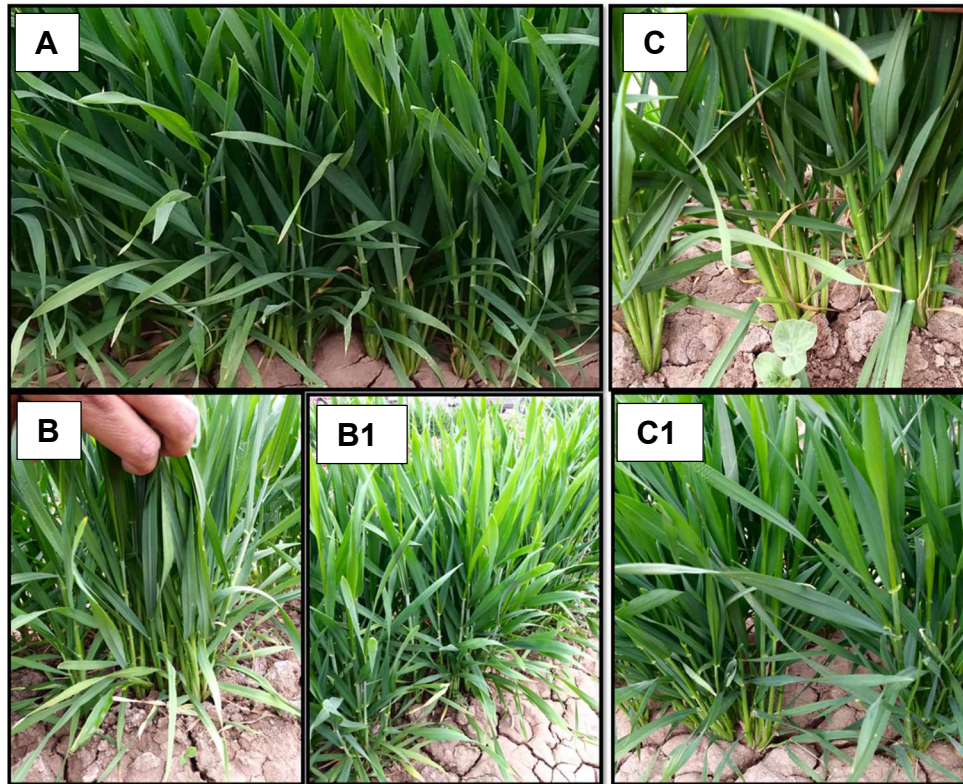


Figura 21. Macollaje de la planta de trigo bajo diferentes tratamientos de fertilización; A) 0 kg de N ha⁻¹, B) y B1) 150 kg de N ha⁻¹ y C) y C1) SLPU.

La Figura 22 muestra la altura de la planta a diferentes etapas fenológica del cultivo de trigo las cuales estarían en el mes 2, 3 y 4 de crecimiento. El cultivo tenía aproximadamente dos meses de desarrollo, por lo cual se encontraba en la etapa fenológica de anthesis o también llamada floración. El tratamiento con 0 kg de N ha⁻¹ presentó una altura de 40.53±1.38 cm, el tratamiento con 150 kg de N ha⁻¹ presentó una altura de 43.68±2.09 y el tratamiento con SLPU presentó una altura de 42.88±4.70. Durante la etapa de maduración lechosa y la transición a maduración pastosa, que se da a los tres meses de desarrollo aproximadamente, el tratamiento con 0 kg de N ha⁻¹ tuvo una altura de 69.80±2.69, el tratamiento con 150 kg de N ha⁻¹ presentó una altura de 68.95±7.71 y el tratamiento con SLPU presentó una altura de 71.60±1.84. Finalmente, durante la etapa de maduración córnea, el cultivo se encuentra listo para su cosecha, la planta presentó una altura de 67.45±3.18 para el tratamiento con 0 kg de N ha⁻¹, el tratamiento con 150 kg de N ha⁻¹ presentó una altura de 68.95±7.71 y el tratamiento con SLPU tuvo una altura de 71.60±1.8. Los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí para cada etapa fenológica del cultivo de trigo.

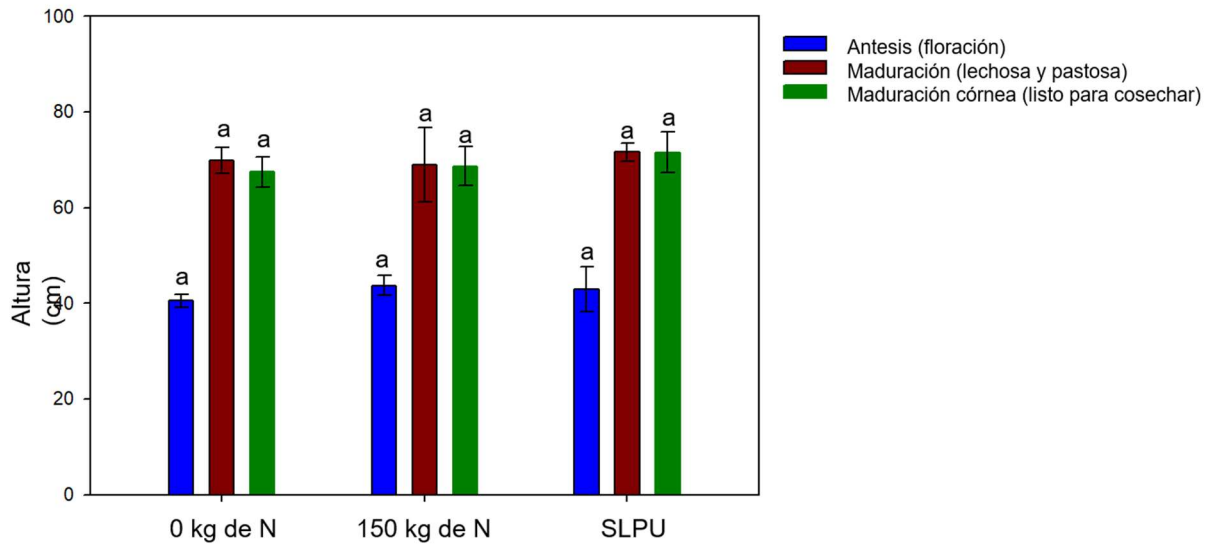


Figura 22. Altura de la planta a 2, 3 y 4 meses de crecimiento (antésis, maduración y maduración córnea) para los tres tratamientos; 0 kg de N ha⁻¹, 150 kg de N ha⁻¹ y SLPU.

La Tabla 5 muestra el rendimiento del grano, peso de 1000 granos y peso hectolítrico. Se observa que los rendimientos de los tratamientos mostraron diferencias significativas entre sí. El peso de 1000 granos de los tratamientos y la semilla no mostró diferencias significativas entre sí, mientras que el peso hectolítrico de los tratamientos y la semilla si mostró diferencias significativas entre sí. El rendimiento con el tratamiento de SLPU mostró un aumento en comparación con los tratamientos de 0 kg de N ha⁻¹ y 150 kg de N ha⁻¹, esto se debe a que el SLPU tiene la capacidad de ir liberando de manera prolongada el nutriente. Además, el aumento de la población microbiana y el cambio en las concentraciones de nitratos y contenidos de materia orgánica pudo haber sido benéfico para el desarrollo de la planta, por lo que se vio reflejado en el rendimiento del SLPU. Mientras que, para el peso de 1000 granos, los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí. Sin embargo, el peso hectolítrico, si mostró diferencias significativas entre sí, siendo diferente al tratamiento con 0 kg de N y similar al tratamiento de 150 kg de N. En la Figura 23 se puede observar el cultivo de trigo en la etapa fenológica de maduración córnea, antes de la cosecha. En la Tabla 6 se observan los datos del análisis de la espiga y el grano de trigo con diferentes tratamientos de fertilización. La longitud de la espiga con el tratamiento de SLPU presentó diferencias significativas en relación con el tratamiento de 0 kg de N ha⁻¹ y 150 kg de N ha⁻¹, presentando mayor longitud. El número de granos por espiga si presentó diferencias significativas, siendo el tratamiento con SLPU el que presentó el mayor número de granos en comparación con los otros tratamientos. El peso de la gluma por espiga no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Mientras que el peso de los granos por espiga tampoco presentó diferencias significativas, pero se observó mayor peso en el tratamiento con SLPU. El número de espigas por m² no presentó diferencias significativas para los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con SLPU mostró un mayor número de espigas por m². El peso de los granos y el número de espigas por m² pudo verse afectado por la posición en la cual se ubicó la unidad experimental, siendo que enfrente o de un lado los tratamientos con 0 kg de N ha⁻¹ pudieron tener tratamientos vecinos con 150 kg de N ha⁻¹ o SLPU, además

Tabla 5. Rendimientos y análisis de la calidad harinera de los granos de trigo a diferentes tratamientos de fertilización.

Tratamiento	Rendimientos (ton ha⁻¹)	Peso de 1000 granos (g)	Peso hL (Kg hL⁻¹)
0 kg de N	7.01±0.40 ^a	50.50±1.21 ^a	84.10±0.14 ^a
150 kg de N	6.09±0.17 ^b	53.43±3.58 ^a	85.05±0.21 ^{a,b}
SLPU	8.05±0.73 ^c	50.28±1.93 ^a	85.60±0.57 ^b
Semillas	NA	56.40±0.22 ^a	79.93±0.32 ^c

Letras distintas significan diferencias significativas entre los tratamientos por columna ($p < 0.05$). NA = no aplica.



Figura 23. Cultivo de trigo (*Triticum durum*) variedad Cirno, antes de la cosecha.

de las variables ambientales, la movilidad del nitrógeno y el posible efecto por riego de gravedad (rodado). Sin embargo, los resultados con el tratamiento de SLPU siguen siendo mayores numéricamente, aunque no presenten diferencias significativas posiblemente por los factores antes mencionados. En la Figura 24 se observa tres espigas obtenidas bajo los tres tratamientos aplicados, donde se puede observar la diferencia en longitud y posiblemente el número de granos.

Durante otras investigaciones se han probado diferentes fertilizantes de liberación prolongada. Zheng et al. (2016) probaron fertilizantes de liberación prolongada en un cultivo de trigo *Triticum aestivum*. Durante este experimento utilizaron un sistema recubierto poliméricamente para que funcionara de manera prolongada (CRU2) con una dosis de 150 kg de N ha⁻¹, aplicándose el 60% antes de la siembra y el 40% restante durante la etapa de macollaje. Los resultados obtenidos por Zheng *et al.* reflejan un rendimiento para el control de 5.39 ton ha⁻¹ y para el CRU2 de 7.43 ton ha⁻¹. Mientras que en este trabajo de investigación se obtuvo un rendimiento mayor equivalente para el control de 7.01±0.40 ton ha⁻¹ y de 8.05±0.73 ton ha⁻¹ con el SLPU. Esto indica una mayor eficiencia en el SLPU con una sola aplicación durante todo el cultivo agrícola. Esto proporciona ventaja de aplicación para el agricultor en términos de ahorro económico por mano de obra y material. Mientras que el número de espigas por m² fue de 484.2 para el control y de 756.7 espigas para el CRU2. Durante esta tesis se obtuvo 327.50±21.92 espigas por metro cuadrado para el control, mientras que para el SLPU se obtuvieron 360±53.74. Estos resultados indican un menor número de espigas por metro cuadrado en comparación con el estudio de Zheng et al. debido a que utilizaron una densidad de siembra mayor a la que se utilizó en este trabajo, las condiciones de siembra no fueron idénticas y por último la semilla y la variedad fueron distintas. El número de granos por espiga fue de 21.8 para el control y de 38.8 granos para el CRU2. Mientras que en esta investigación el número de granos para el control fue de 64.40±1.14 y 67.00±2.65 para el SLPU.

Tabla 6. Análisis de la espiga y el grano de la planta de trigo a diferentes tratamientos de fertilización

Tratamientos	Longitud de espiga (cm)	Número de granos por espiga	Peso de la espiga (g)	Peso de los granos por espiga (g)	Número de Espigas por m ²
0 kg de N ha ⁻¹	7.10±0.04 ^a	64.40±1.14 ^{a,b}	4.09±0.05 ^a	3.15±0.16 ^a	327.50±21.92 ^a
150 kg de N ha ⁻¹	7.01±0.4 ^a	59.77±1.07 ^a	3.86±0.30 ^a	3.46±0.08 ^a	244.50±13.44 ^a
SLPU	7.39±0.08 ^b	67.00±2.65 ^b	4.11±0.11 ^a	3.49±0.22 ^a	360.00±53.74 ^a

Letras distintas significan diferencias significativas entre los tratamientos por columna ($p < 0.05$).



Figura 24. Espigas de trigo cristalino (*Triticum durum*) variedad Cirno bajo tras tratamientos de fertilización; A) SLPU, B) 150 kg de N ha⁻¹ y C) 0 kg de N ha⁻¹.

Cabe destacar la amplia diferencia de número de granos entre el control y los sistemas de liberación, siendo el SLPU el de mayor efectividad. Por último, el peso de 1000 granos para el control fue de 37.3 g mientras que para el CRU2 fue de 40.8 g. En este trabajo se obtuvo el peso de 1000 granos para el control de 50.50 ± 1.21 y 50.28 ± 1.93 para el SLPU. Estos resultados no mostraron diferencias significativas entre sí, sin embargo, entre los dos experimentos, si se mostraron amplias diferencias en cuestión del peso de 1000 granos. El SLPU presentó mejores resultados en comparación con el reportado por Zheng *et al.* esto indica que el grano que fue tratado con el SLPU tiene mejor calidad, según esta prueba de calidad el grano de trigo probablemente tenga que ver con el tipo de grano y su variedad, así mismo, las condiciones climáticas que prevalecieron durante el cultivo. Sin embargo, aun así, el SLPU presente mejores resultados en comparación con lo reportado en la literatura.

Análisis de suelo agrícola

La Tabla 7 muestra el análisis del suelo con textura franco-areno-arcillosa antes de la siembra y después de la siembra (para los tres tratamientos). En la cual se puede observar que antes de la siembra el suelo presentó una textura franco-arcillosa, según el diagrama textural del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). Además, muestran los resultados después de la cosecha, para el tratamiento con $0 \text{ kg de N ha}^{-1}$ se obtuvo el suelo con textura franco-arcillosa, con lo cual se demuestra que, por efecto de la nula aplicación de fertilizante, el suelo mantuvo su textura. Solo hubo disminuciones en la cantidad de nitratos debido a que la planta aprovechó este nutriente, además de las transformaciones y pérdidas de este. Sin embargo, la materia orgánica aumentó, probablemente por los restos de las plantas y el incremento de las poblaciones de microorganismos que ayudaron a la fijación de otros nutrientes. El suelo con el tratamiento de $150 \text{ kg de N ha}^{-1}$, presentó textura arcillosa, cambiando ligeramente su textura original, a su vez que aumentó el contenido de nitratos. Mientras que el suelo con el tratamiento de SLPU presentó una textura arcillosa, también logrando

cambios ligeros en su textura. Sin embargo, aumentó el contenido de nitratos debido a la constante liberación de urea la cual fue transformada durante el ciclo de nitrógeno. Como se mostró en resultados anteriores, el SLPU no se degradó completamente al finalizar el ciclo del cultivo. Por lo cual se puede sospechar de una continua aportación de urea y nitrógeno al suelo agrícola, lo cual conlleva a un aumento de las formas de nitrógeno, principalmente nitratos.

Tabla 7. Análisis químico del suelo con textura franco-areno-arcillosa, antes y después de la siembra experimenta de trigo cristalino (*Triticum durum*) variedad *Cirno* del ciclo 2018 -2019.

Suelo textura franco-areno-arcillosa				
	Antes de la siembra	Después de la cosecha		
		0 kg de N	150 kg de N	SLPU
Arcilla	31%	35%	33%	33%
Limo	26%	26%	22%	24%
Arena	43%	39%	45%	43%
pH	7.46	8.05	8.02	8.03
Nitratos	53.94 ppm	36.58 ppm	63.86 ppm	81.84 ppm
M.O.	0.54%	1.14	0.74%	0.80

CONCLUSIONES

1. Mediante un método simple fue posible obtener un sistema de liberación prolongada de urea, basado en la mezcla de gluten de trigo y urea, presentando una estructura porosa con diámetros a escala micrométrica.
2. La urea y el gluten de trigo presentan interacción entre los grupos carbonilo y amino, mediante puentes de hidrógeno, lo cual facilita la liberación al contacto con el agua.
3. El SLPU tiene facilidad para desorber la urea, según la isoterma de Freundlich y el análisis de FTIR. Por lo que el SLPU podría funcionar como un fertilizante de liberación prolongada.
4. El SLPU presenta características favorables para su clasificación como un material con capacidad de absorción y retención de agua, característica benéfica para su aplicación en campo.
5. El SLPU presenta un efecto prolongado de liberación en agua a 25°C, lo cual, indica que es apto para ser un SLPU en campos agrícolas.
6. El SLPU presenta una dinámica de nitrógeno en sus formas de NO_3^- y NH_4^+ apropiada de acuerdo con la liberación prolongada.
7. El SLPU cambia la composición fisicoquímica del suelo agrícola y a su vez, provoca un aumento en la población del consorcio microbiano, incluyendo microorganismos que pueden ayudar a la transformación del nitrógeno en nitratos y obtener un suelo con una concentración de este nutriente viable para las siembras posteriores.
8. La eficiencia del SLPU logra una reducción en las pérdidas de N hacia el medio ambiente.
9. El SLPU puede ser aplicado en cultivos de trigo ya que funciona como un fertilizante de liberación prolongada, beneficiando la buena formación de la espiga y el grano, y por consiguiente aumentando el rendimiento del cultivo.

REFERENCIAS

- Aguilera, E., Lassaletta, L., Sanz-Cobena, A., Garnier, J., & Vallejo, A. (2013). The potential of organic fertilizers and water management to reduce N₂O emissions in Mediterranean climate cropping systems. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *164*, 32-52.
- Akhtar, M., Naeem, A., Akhter, J., Bokhari, S. A., & Ishaque, W. (2011). Improvement in nutrient uptake and yield of wheat by combined use of urea and compost. *Soil Environ*, *30*(1), 45-49.
- Alam, M. A., Khan, A. A., Alam, M. K., Sarker, Z. I., & Rahman, M. M. (2013). Variability and diversity studies in durum wheat (*Triticum durum*). *Journal of Science and Technology*, *1*, 5.
- Amir, R. M., Anjum, F. M., Khan, M. I., Khan, M. R., Pasha, I., & Nadeem, M. (2013). Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. *Journal of food science and technology*, *50*(5), 1018-1023.
- Andreetta, H. A. (2003). Fármacos de acción prolongada: mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, *22*(4), 355-364.
- Andrew, D. R., Fitak, R. R., Munguia-Vega, A., Racolta, A., Martinson, V. G., & Dontsova, K. (2012). Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran Desert soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(21), 7527-7537.
- Asif, M., Tunc, C. E., Yazici, M. A., Tutus, Y., Rehman, R., Rehman, A., & Ozturk, L. (2019). Effect of predicted climate change on growth and yield performance of wheat under varied nitrogen and zinc supply. *Plant and soil*, *434*(1-2), 231-244.
- Atiyeh, R. M., Subler, S., Edwards, C. A., Bachman, G., Metzger, J. D., & Shuster, W. (2000). Effects of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedobiologia*, *44*(5), 579-590.
- Azeem, B., KuShaari, K., Man, Z. B., Basit, A., & Thanh, T. H. (2014). Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer. *Journal of Controlled Release*, *181*, 11-21.

- Bandopadhyay, A., & Das, N. (2017). Plant growth promoting microbial consortial formulations mediated biological control of stem and root rot disease of jute caused by *Macrophomina phaseolina*, 1-15.
- Barlow, K. M., Christy, B. P., O'leary, G. J., Riffkin, P. A., & Nuttall, J. G. (2015). Simulating the impact of extreme heat and frost events on wheat crop production: A review. *Field Crops Research*, 171, 109-119.
- Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim et Biophys Acta (BBA)-Bioenerget*, 1767(9), 1073–1101.
- Barreras-Urbina, C. G., Rodríguez-Félix, F., López-Ahumada, G. A., BurrueI-Ibarra, S. E., Tapia-Hernández, J. A., Castro-Enríquez, D. D., & Rueda-Puente, E. O. (2018). Microparticles from wheat-gluten proteins soluble in ethanol by nanoprecipitation: preparation, characterization, and their study as a prolonged-release fertilizer. *International Journal of Polymer Science*, 2018.
- Caballero-Mellado, J. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 154-161.
- Calabria, L., Vieceli, N., Bianchi, O., De Oliveira, R. V. B., do Nascimento Filho, I., & Schmidt, V. (2012). Soy protein isolate/poly (lactic acid) injection-molded biodegradable blends for slow release of fertilizers. *Industrial crops and products*, 36(1), 41-46.
- Cameron, K. C., Di, H. J., & Moir, J. L. (2013). Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of Applied Biology*, 162(2), 145-173.
- Castro-Enríquez, D. D., Rodríguez-Félix, F., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez, P. I., Castillo-Ortega, M. M., Rodríguez-Félix, D. E., Armenta-Villegas, L. & Ledesma-Osuna, A. I. (2012). Preparation, characterization and release of urea from wheat gluten electrospun membranes. *Materials*, 5(12), 2903-2916.
- Chavda, H. V., & Patel, C. N. (2011). Effect of crosslinker concentration on characteristics of superporous hydrogel. *International journal of pharmaceutical investigation*, 1(1), 17.

- Corradini, E., De Moura, M. R., & Mattoso, L. H. C. (2010). A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer. Letters*, 4(8), 509-515.
- Dai, Z., Su, W., Chen, H., Barberán, A., Zhao, H., Yu, M., ... & Xu, J. (2018). Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. *Global change biology*, 24(8), 3452-3461.
- David, M. D. R. L. J., Uribe, S., & Vásquez, L. M. L. (2015). Una Estrategia de Innovación en Fertilizantes Orgánicos Mediante Lógica Difusa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7423-7439.
- David, M. D. R. L. J., Uribe, S., & Vásquez, L. M. L. (2015). Una Estrategia de Innovación en Fertilizantes Orgánicos Mediante Lógica Difusa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7423-7439.
- Davidson, D., & Gu, F. X. (2012). Materials for sustained and controlled release of nutrients and molecules to support plant growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 870-876.
- Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annual review of food science and technology*, 3, 469-492.
- Desai, T. R., Desai, V. T., Shah, K. V., Tirgar, P. R., Sheth, D. B., & Goyal, R. K. (2011). Pharmacognostic characterization of triticum durum (wheat species). *Asian Journal of Pharmaceutical Research*. Vol, 1(2), 38-41.
- Dórame-Miranda, R. F., Rodríguez-Félix, D. E., López-Ahumada, G. A., Castro-Enriquez, D. D., Quiroz-Castillo, J. M., Márquez-Ríos, E., & Rodríguez-Félix, F. (2018). Effect of pH and temperature on the release kinetics of urea from wheat-gluten membranes obtained by electrospinning. *Polymer Bulletin*, 75(11), 5305-5319.
- Fernández, J. A., Santos, R. G., Guerra, N. B., & Valdés, L. O. (2010). Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por hap-200/poviac/caco3. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(2), 119-130.

- Ferrari, S., Júnior, E. F., Godoy, L. J. G. D., Ferrari, J. V., Souza, W. J. O. D., & Alves, E. (2015). Effects on soil chemical attributes and cotton yield from ammonium sulfate and cover crops. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(1), 75-83.
- Ge, G., Li, Z., Fan, F., Chu, G., Hou, Z., & Liang, Y. (2010). Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. *Plant and Soil*, 326(1-2), 31.
- Georgopoulos, T., Larsson, H., & ELIASSON, A. C. (2006). Influence of native lipids on the rheological properties of wheat flour dough and gluten. *Journal of texture studies*, 37(1), 49-62.
- González, M. E., Cea, M., Medina, J., González, A., Diez, M. C., Cartes, P., & Navia, R. (2015). Evaluation of biodegradable polymers as encapsulating agents for the development of a urea controlled-release fertilizer using biochar as support material. *Science of the Total Environment*, 505, 446-453.
- Guo, L., Ning, T., Nie, L., Li, Z., & Lal, R. (2016). Interaction of deep placed controlled-release urea and water retention agent on nitrogen and water use and maize yield. *European Journal of Agronomy*, 75, 118-129.
- Hammann, F., & Schmid, M. (2014). Determination and quantification of molecular interactions in protein films: A review. *Materials*, 7(12), 7975-7996.
- Hernández-Téllez, C. N., Cortez-Rocha, M. O., Hernández, A. B., Rosas-Burgos, E. C., Lizardi-Mendoza, J., Torres-Arreola, W., & Plascencia-Jatomea, M. (2018). Chitosan/carrageenan/lysozyme particles: synthesis, characterization and antifungal activity against *Aspergillus parasiticus*. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 897-912.
- Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L., & Melton, T. (2015). *Azotobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-33.
- Kim, S. J., Park, S. J., & Kim, S. I. (2003). Swelling behavior of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly (vinyl alcohol) and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 55(1), 53-59.

- Kuzyakov, Y., & Xu, X. (2013). Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist*, *198*(3), 656-669.
- Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., Revilla, P., & Domínguez, J. (2013). Short-term effects of organic and inorganic fertilizers on soil microbial community structure and function. *Biology and Fertility of Soils*, *49*(6), 723-733.
- Li, Q., Ma, Z., Yue, Q., Gao, B., Li, W., & Xu, X. (2012). Synthesis, characterization and swelling behavior of superabsorbent wheat straw graft copolymers. *Bioresource technology*, *118*, 204-209.
- Liu, T. Q., Fan, D. J., Zhang, X. X., Chen, J., Li, C. F., & Cao, C. G. (2015). Deep placement of nitrogen fertilizers reduces ammonia volatilization and increases nitrogen utilization efficiency in no-tillage paddy fields in central China. *Field Crops Research*, *184*, 80-90.
- Martins, M. R., Jantalia, C. P., Polidoro, J. C., Batista, J. N., Alves, B. J., Boddey, R. M., & Urquiaga, S. (2015). Nitrous oxide and ammonia emissions from N fertilization of maize crop under no-till in a Cerrado soil. *Soil and Tillage Research*, *151*, 75-81.
- Mauricio-Iglesias, M., Peyron, S., Guillard, V., & Gontard, N. (2010). Wheat gluten nanocomposite films as food-contact materials: Migration tests and impact of a novel food stabilization technology (high pressure). *Journal of applied polymer science*, *116*(5), 2526-2535.
- Morgan, K. T., Cushman, K. E., & Sato, S. (2009). Release mechanisms for slow- and controlled-release fertilizers and strategies for their use in vegetable production. *HortTechnology*, *19*(1), 10-12.
- Nandi, S., & Winter, H. H. (2005). Swelling behavior of partially cross-linked polymers: a ternary system. *Macromolecules*, *38*(10), 4447-4455.
- Naz, M. Y., & Sulaiman, S. A. (2016). Slow release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: a review. *Journal of Controlled Release*, *225*, 109-120.

- Nuttall, J. G., O'Leary, G. J., Panozzo, J. F., Walker, C. K., Barlow, K. M., & Fitzgerald, G. J. (2017). Models of grain quality in wheat—A review. *Field crops research*, 202, 136-145.
- Ooms, N., Jansens, K. J., Pareyt, B., Reyniers, S., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2018). The impact of disulfide bond dynamics in wheat gluten protein on the development of fermented pastry crumb. *Food chemistry*, 242, 68-74.
- Ortolan, F., & Steel, C. J. (2017). Protein characteristics that affect the quality of vital wheat gluten to be used in baking: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 369-381.
- Ozel, B., Uguz, S. S., Kilercioglu, M., Grunin, L., & Oztop, M. H. (2017). Effect of different polysaccharides on swelling of composite whey protein hydrogels: A low field (LF) NMR relaxometry study. *Journal of food process engineering*, 40(3), e12465.
- Peña, R. J. (2002). III. Influencia de la textura del endospermo y la composición de las proteínas del gluten en la calidad panadera del trigo.
- Pérez-Tello, M., Rodríguez-Felix, F., Castillo-Ortega, M. M., & Sánchez-Corrales, V. M. (2011). A kinetic model for the adsorption of gold from I²/I⁻ solutions onto a porous polymer membrane. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(2), 1695-1706.
- Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, P. M. (2003). Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*. L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *European Food Research and Technology*, 216(2), 138-144.
- Qiao, C., Liu, L., Hu, S., Compton, J. E., Greaver, T. L., & Li, Q. (2015). How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Global change biology*.
- Qiao, C., Liu, L., Hu, S., Compton, J. E., Greaver, T. L., & Li, Q. (2015). How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Global change biology*.
- Ramirez-Wong, B., Rodríguez-Félix, F., Torres-Chávez, P. I., Medina-Rodríguez, C. L., Matus-Barba, E. A., & Ledesma-Osuna, A. I. (2014). Effects of nitrogen

- and irrigation on gluten protein composition and their relationship to “yellow berry” disorder in wheat (*Triticum aestivum*). *Pak. J. Bot*, 46(5), 1797-1804.
- Rizwan, M., Yahya, R., Hassan, A., Yar, M., Azzahari, A. D., Selvanathan, V., & Abouloula, C. N. (2017). pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications. *Polymers*, 9(4), 137.
- Robertson, G. H., Cao, T. K., Gregorski, K. S., Hurkman, W. J., Tanaka, C. K., Chiou, B. S., & Orts, W. J. (2014). Modification of vital wheat gluten with phosphoric acid to produce high free swelling capacity. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(2).
- Rodríguez, P., San Martín, M. E., & González de la Cruz, G. (2001). Calorimetría diferencial de barrido y rayos-x del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada. *Superficies y Vacío. Soc. Mex. de Cien. Superficies y Vacío*, 13, 61-65.
- Rodríguez-Félix, F., Ramirez-Wong, B., Torres-Chávez, P.I., Álvarez-Avilés, A., Moreno-Salazar, S., & Rentería-Martínez, M. E., & Bello-Pérez, L. A. (2014). Yellow Berry, Protein and Agronomic Characteristics in Bread Wheat Under Different Conditions of Nitrogen and Irrigation in Northwest Mexico. *Pakistan Journal of Botany*, 46(1), 221-226.
- Sebilo, M., Mayer, B., Nicolardot, B., Pinay, G., & Mariotti, A. (2013). Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45), 18185-18189.
- Setubal, J. C., Dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., & Curatti, L. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of bacteriology*, 191(14), 4534-4545.
- Shamim, M. I. A., DIJKSTRA, F. A., ABUYUSUF, M., & HOSSAIN, A. I. (2015). Synergistic effects of biochar and NPK fertilizer on soybean yield in an alkaline soil. *Pedosphere*, 25(5), 713-719.
- Shewry, P. R., Hawkesford, M. J., Piironen, V., Lampi, A. M., Gebruers, K., Boros, D., Anderson, A. A. M., Aman, P., Rakszegi, M., Bolta, Z. & Ward, J. L. (2013).

- Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(35), 8295-8303.
- Shibata, H., Galloway, J. N., Leach, A. M., Cattaneo, L. R., Noll, L. C., Erisman, J. W., ... & Dalgaard, T. (2017). Nitrogen footprints: Regional realities and options to reduce nitrogen loss to the environment. *Ambio*, 46(2), 129-142.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2014). URL: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado>.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2019).
- Singh, N., Verma, P., & Pandey, B. R. (2012). Therapeutic Potential of Organic Triticum aestivum Linn.(Wheat Grass) in Prevention and Treatment of Chronic Diseases: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 4(1), 10-14.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T., Settle, F. A., Rubinson, K. A., Rubinson, J. F., & Chasteen, T. G. (2002). Principios de análisis instrumental. *México 2008*.
- Tapia-Hernández, J. A., Rodríguez-Félix, D. E., Plascencia-Jatomea, M., Rascón-Chu, A., López-Ahumada, G. A., Ruiz-Cruz, S., & Rodríguez-Félix, F. (2018). Porous wheat gluten microparticles obtained by electrospray: Preparation and characterization. *Advances in Polymer Technology*, 37(6), 2314-2324.
- Tapia-Hernández, J. A., Torres-Chávez, P. I., Ramírez-Wong, B., Rascón-Chu, A., Plascencia-Jatomea, M., Barreras-Urbina, C. G., & Rodríguez-Félix, F. (2015). Micro-and nanoparticles by electrospray: advances and applications in foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(19), 4699-4707.
- Tétard-Jones, C., Edwards, M. G., Rempelos, L., Gatehouse, A. M., Eyre, M., Wilcockson, S. J., & Leifert, C. (2013). Effects of previous crop management, fertilization regime and water supply on potato tuber proteome and yield. *Agronomy*, 3(1), 59-85.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Casey, P., Muster, T., Gill, H., & Adhikari, B. (2015). Enhanced efficiency fertilisers: a review of formulation and nutrient release patterns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1131-1142.
- Trinh, T., Ku Shaari, K. Z., Shuib, A., & Ismail, L. (2014). Modeling of urea release from coated urea for prediction of coating material diffusivity.

- Versypt, A. N. F., Pack, D. W., & Braatz, R. D. (2013). Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres—a review. *Journal of controlled release*, 165(1), 29-37.
- Vital López, L., Hernández, C., Fernández Dávila, S., & Mendoza Herrera, A. (2015). Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. *Phyton (Buenos Aires)*, 84(1), 233-243.
- Wang, S., Radny, D., Huang, S., Zhuang, L., Zhao, S., Berg, M., & Zhu, G. (2017). Nitrogen loss by anaerobic ammonium oxidation in unconfined aquifer soils. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*, 24(2), 115-119.
- Xiao, X., Yu, L., Xie, F., Bao, X., Liu, H., Ji, Z., & Chen, L. (2017). One-step method to prepare starch-based superabsorbent polymer for slow release of fertilizer. *Chemical Engineering Journal*, 309, 607-616.
- Zaleski, R., Stefaniak, W., Gorgol, M., Gil, M., Krasucka, P., & Goworek, J. (2019). Swelling of cross-linked polymers in silicones of different molecular weight. *Polymer*, 179, 121611.
- Zeng, J., Liu, X., Song, L., Lin, X., Zhang, H., Shen, C., & Chu, H. (2016). Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 92, 41-49.
- Zhang, Y., Tu, D., Shen, Q., & Dai, Z. (2019). Fish scale valorization by hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for gelatin hydrolysate production. *Molecules*, 24(16), 2998.
- Zheng, W., Zhang, M., Liu, Z., Zhou, H., Lu, H., Zhang, W., & Chen, B. (2016). Combining controlled-release urea and normal urea to improve the nitrogen use efficiency and yield under wheat-maize double cropping system. *Field Crops Research*, 197, 52-62.
- Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2007). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology* (pp. 1-40). Springer New York.
- Zhou, Z., Du, C., Li, T., Shen, Y., Zeng, Y., Du, J., & Zhou, J. (2015). Biodegradation of a biochar-modified waterborne polyacrylate membrane coating for

controlled-release fertilizer and its effects on soil bacterial community profiles. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8672-8682.

ANEXOS

Esta sección consta de un artículo publicado en el journal Polymer Bulletin indexado en JCR y cuenta con un factor de impacto de 1.85. Además, un artículo enviado al journal Science of the Total Environment de la editorial Elsevier indexado en JCR y cuenta con un factor de impacto de 5.58. Se muestra un artículo de revisión en proceso, sobre los sistemas de liberación y por último, una estancia de investigación realizada en el Instituto de Agrobiotecnología en Mutilva Baja, Navarra, España.

Anexo 1

Polymer Bulletin
https://doi.org/10.1007/s00289-019-03074-6

ORIGINAL PAPER



Simple method to obtaining a prolonged-release system of urea based on wheat gluten: development and characterization

C. G. Barreras-Urbina¹ · M. Plascencia-Jatomea¹ · F. J. Wong-Corral¹ · M. Pérez-Tello² · A. I. Ledesma-Osuna¹ · J. A. Tapia-Hernández¹ · D. D. Castro-Enriquez³ · E. O. Rueda-Puente³ · F. Rodríguez-Félix¹

Received: 23 July 2019 / Revised: 28 November 2019 / Accepted: 13 December 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Urea is one of the most widely used nitrogen fertilizers. However, it is lost to the environment via processes such as denitrification, surface runoff, volatilization, and leaching. In this paper, a novel material is reported on, with low production cost and avoiding the use of harmful solvents, with a pastille morphology developed by a simple method from a mixture of wheat gluten and urea, with potential use as a prolonged-release system of urea (PRSU). The PRSU obtained was characterized by scanning electron microscopy, kinetics of water absorption, equilibrium water content (EWC), Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy analysis, and release kinetics. The PRSU diameter was 2.46 cm, and its thickness was 0.17 cm. The PRSU showed physical and structural characteristics such as micropores and hollow fractions in its structure. In addition, the wheat gluten pastille is classified as a swelling material and demonstrated an EWC of $58.47 \pm 1.50\%$. FT-IR analysis of the samples showed hydrogen-bond interactions between the amino and carbonyl groups in the urea and the wheat gluten proteins. Laboratory tests showed that the system can release 97% of the urea within 8–10 h. These results showed that the PRSU presents suitable characteristics for its application as a fertilization alternative for carrying out better agronomic practices.

Keywords Urea · Wheat gluten · Prolonged-release system · Wheat gluten-urea composite

✉ F. Rodríguez-Félix
rodriguez_felix_fco@hotmail.com

¹ Departamento de Investigación Y Posgrado en Alimentos (DIPA), Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, México

² Departamento de Ingeniería Química Y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, México

³ Departamento de Agricultura Y Ganadería, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, México

Published online: 01 January 2020

Springer

Introduction

Urea is one of the most widely used fertilizers due to its low cost and plays an important role in the productivity of agricultural fields worldwide [1]. At industrial scale, urea fertilizers are produced from natural gas, which is recaptured from the flue gases, producing CO_2 and NH_3 . Urea is formed by a heterogeneous reaction between ammonia and carbon dioxide to form ammonium carbamate ($\text{NH}_2\text{COONH}_4$) and water. Then, a dehydration process is formed resulting in dehydrated urea. After this process, the industries sell the granulated urea as a fertilizer [2, 3].

Upon its application in the soil, urea is mostly lost by denitrification, surface runoff, volatilization, and leaching processes [4]. These losses contribute to the emission of greenhouse gases such as nitrogen dioxide, which is the main anthropogenic pollutant caused by nitrogen fertilization [5, 6].

However, urea continues to be used very common in agricultural fields. It is estimated that the use of urea is equivalent to 78% of the total nitrogen fertilizers [7, 8]. In addition, it has been recently reported that in terms of the nitrogen contributed by various nitrogen fertilizers, such as urea, more than 55% of this primary nutrient is not taken up by the plant in agricultural fields [9].

Currently, the world population is increasing and with this a greater demand for food, which leads to greater exploitation of the agricultural fields. These conditions in turn lead to an increase in the use of fertilizers. However, these practices increase environmental risks, due to the pollutants released to the environment [10, 11]. Recently, the study of new alternatives to avoid nitrogen losses has become necessary due to the environmental and practical issues entailed in agricultural fields. Currently, the research also has been focused on avoiding limited yields and increasing the quality of agricultural products [7, 12].

In recent decades, prolonged-release fertilizers (PRF) and controlled-release fertilizers (CRF) are being developed as alternatives for the issues mentioned above. These types of systems have the ability to release nutrients with a rate which is according to the plant needs and thus avoid its loss to the environment [13]. In recent years, several fertilizer-release systems have been developed, such as urea-formaldehyde (UF) or methylene urea (MU); both systems considered as slow or prolonged-release systems [14]. Also, systems such as sulfur-coated urea and polymer-coated urea have been made, and these systems are considered as CRF [14, 15]. However, UF, MU, sulfur-coated urea, and polymer-coated urea systems present several disadvantages, such as variations in their performance with respect to the action of the microorganisms, the season of the year, and even the combination of these with fumigations or chemical pest controls [16]. There are commercial controlled-release fertilizers which are developed by several industries such as Tennessee Valley Authority (TVA), USA, Agrium Inc. Calgary, Fertilizers, Jagdishpur (UP), India, and Shandong Kingenta Ecological Engineering Co., Ltd., China. However, this type of fertilizers presents high production costs, which make them useful for horticultural and ornamental crops; moreover, they are unfeasible on large-scale crops [13]. The high-cost production problem

is present in the slow-release fertilizers such as urea-coated polymers, which are fabricated and commercialized by industries as Osmocote Plus, Nutricote Total with Minor Nutrients, and Polyon Coated NPK Plus [17]. Also, slow-release fertilizers as polyethylene-coated urea, sulfur-coated urea, and superphosphate-coated urea are used due to its slow release of nutrients. However, the high production cost is still the issue that makes them useful only in developed countries [18]. Hence, it is important to study new methods and systems that help to improve agronomic practices to establish a nitrogen-use efficiency.

The use of nanotechnologies and microtechnologies in the development of a prolonged-release system of urea (PRSU) has been reported using several materials, such as potato starch [7], wheat gluten membranes [19], nanocomposites of paraformaldehyde with montmorillonite clay [6], and starch superabsorbent polymer [20]. Barreras-Urbina et al. [21] developed microparticles and nanoparticles via nanoprecipitation process for their potential application in agricultural fields, specifically the use of natural polymers such as gliadins and low molecular weight (LMW) proteins from wheat gluten, and Tapia-Hernández et al. [22] developed wheat gluten porous microparticles by the electrospray technique.

Wheat gluten is a natural polymer made up of low molecular weight (LMW) proteins (gliadins (28,000–35,000 Da)) and high molecular weight (HMW) proteins (glutenins (70,000 \geq 10 million Da)) [23, 24]. These provide the rheological properties of wheat flour for the preparation of various bakery products. Wheat gluten is considered a suitable biopolymer for the development of materials with potential application in agriculture [19]. This is due to its ease of obtention because it is a by-product of starch isolation [24, 25]. Also, this biopolymer is considered suitable for the development of materials due to its low cost and viscoelastic properties [22].

However, the wheat gluten materials obtained through the electrospinning and electrospray techniques involve the use of non-ecofriendly solvents, demand a high energy consumption, and offer low yields with long production times [26]. Considering the environmental issues caused by the loss of compounds deriving from urea in agricultural fields, it is of interest to investigate the potential use of alternative materials capable of reducing this problem. The aim of this work was the development of a simple and faster method to obtain a prolonged-release system of fertilizer based on wheat gluten and urea. In this paper, we report its preparation and its characterization by scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis, the kinetics of water absorption, and urea-release study.

Materials and methods

Materials

The materials used included commercial wheat gluten (Rockette), urea (purity 99.4%, Faga Lab), a RANDOX Urea determination kit, and distilled water.

Development of a prolonged-release system of urea

The PRSU was prepared by adding 1 mL of 1 M urea solution to 0.55 g of wheat gluten. The components were thoroughly mixed and kneaded, and the shape was adjusted manually to make the PRSU. Two geometries were tested: (1) pastille (2.46 ± 0.07 cm diameter average, 0.17 ± 0.02 cm thickness average) and (2) finite cylinder (0.81 ± 0.03 cm diameter average, 1.73 ± 0.13 cm length average). Also, a prolonged-release system (PRS) without urea was developed as a blank sample. Finally, the PRSU and PRS without urea were frozen and freeze-dried using a Labconco lyophilizer equipment (model FreeZone 6; Kansas City, MO, USA).

Scanning electron microscopy (SEM)

The morphological characteristics of the pastilles were observed using a JEOL model 5410LV SEM equipment operated at 20 kV and 15 kV. The samples were gold-sputtered prior to examination.

Kinetics of water absorption

The kinetics of water absorption of the samples was studied by placing the pastille in a beaker containing 400 mL of distilled water with neutral pH at 25 °C. At pre-specified time intervals, the sample was taken out of the vessel and its weight was measured with an analytical balance, upon which the sample was returned to the vessel. The procedure was repeated until no weight change of the sample was observed. The kinetics of the water absorption process was tracked by means of the following relationship [27]:

$$Q = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (1)$$

where m_0 —weight of dry sample, m_t —weight of sample at time t , Q —water concentration at time t , which means the mass of water per mass of dry sample at time t .

The above procedure was followed with both PRS and PRSU. Also, the water absorption in the equilibrium of the pastille was obtained using the equilibrium water content (EWC) that was calculated using the following equation [28]:

$$EWC(\%) = \left(\frac{W_e - W_d}{W_e} \right) \times 100 \quad (2)$$

where EWC (%) is the percentage of equilibrium water content, W_e is the weight of the swollen sample at equilibrium, and W_d is the weight of the dry sample.

Fourier-transform Infrared spectroscopy (FT-IR) analysis

FT-IR analysis of the samples in solid form was performed using FT-IR equipment (PerkinElmer model Subtech Spectrum) with an attenuated total reflectance (ATR) diamond detector employing wavenumber from 4000 to 400 cm^{-1} .

Prolonged-release study

The PRSU was placed in a beaker with 1 L. of distilled water at 25 °C, and the system was stirred using a magnetic stirrer (IKA C-MAG HS7). Measurements of the urea concentration in the distilled water were carried out from 0 to 24 h. The RAN-DOX Urea determination kit was used, and the urea concentration in the medium was measured using a UV-Vis spectrophotometer (VARIAN Cary 50) at 695 nm. Measurements of the urea concentration were performed by triplicate.

Results and discussions

Prolonged-release system of urea

Figure 1 shows the pictures of the pastille and cylindrical geometries (Fig. 1a, b, respectively). The pastille geometry presents a homogeneous structure with no apparent porosities and a circumference with uniform thickness in comparison with the cylindrical geometry. However, the cylindrical geometry shows a high porosity, and its structure is not completely uniform due to that during the elaboration, a larger diameter appeared on both ends of the cylinder, giving an inhomogeneous

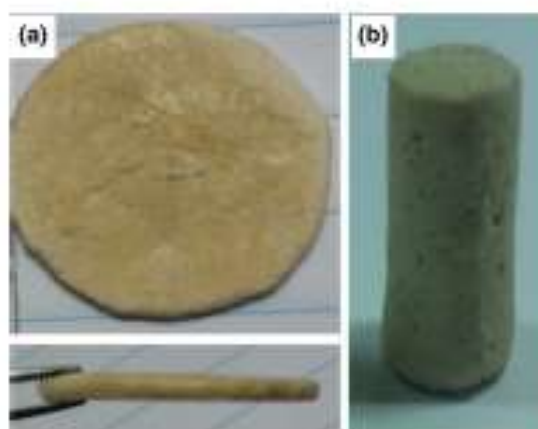


Fig. 1 Wheat gluten pastille geometry (a) and wheat gluten cylindrical geometry (b)

geometric structure. Therefore, due to these physical characteristics and development issues of the material, the most suitable geometry for conducting the PRSU was pastille.

Scanning electron microscopy

The surfaces and cross sections of the PRS and PRSU are presented in this section. Figure 2 shows SEM micrographs employing a magnification of 100 \times of the PRSU surface (a) and of the PRS surface (b), and also, using 500 \times magnification for the PRSU surface (c) and that of the PRS (d), in which it can be observed that the PRSU shows an asymmetric surface rendered by the hollow fractions and pores in micrometric scale. Figure 3 depicts SEM micrographs of the PRSU cross section using magnifications of 75 \times (a) and 350 \times (c), respectively, while the PRS SEM micrographs are shown with magnifications of 75 \times (b) and 350 \times (d), respectively. These micrographs show the asymmetric structure in a cross section, revealing micrometric pores and channels inside the PRSU and

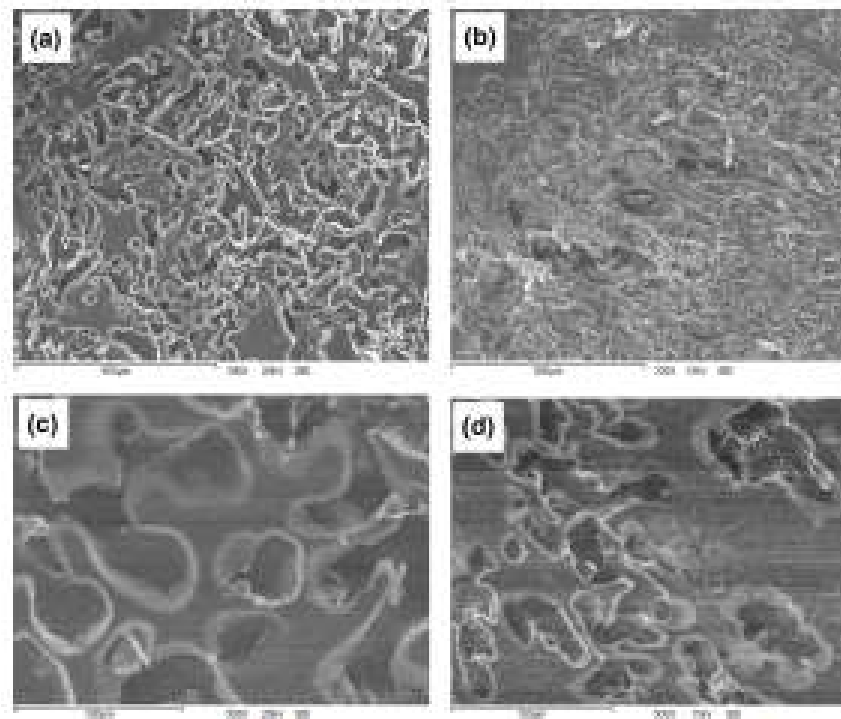


Fig. 2 SEM micrographs of the PRSU surface using magnifications of 100 \times (a) and 500 \times (c), and SEM micrographs of the PRS surface using magnifications of 100 \times (b) and 500 \times (d)

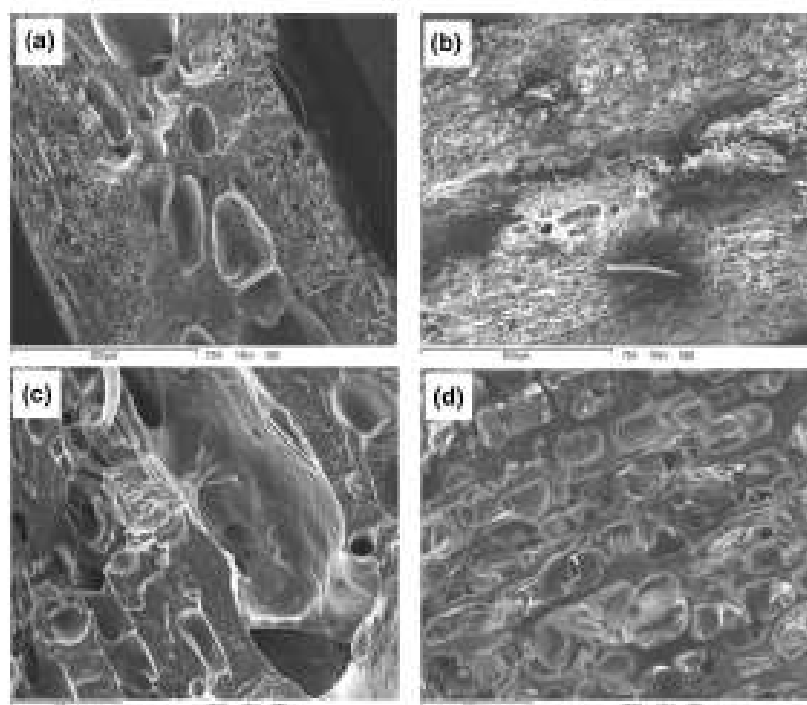


Fig. 3 Cross section of the SEM micrographs of the PRSU using 75 \times (a) and 350 \times (c), and the cross section of the SEM micrographs of the PRS using 75 \times (b) and 350 \times (d)

the PRS. The pores in the asymmetric structures of the PRSU and PRS pastilles were probably formed at the moment of water extraction through freeze-dried process. These hollow spaces provide the formation of pores and channels inside. This is probably due to that during the development of the PRSU and the PRS, a part of the process comprises the kneading of the system and then the formation of the pastille geometry. During this mixture of the urea and the PRS, air bubbles are probably immersed in the matrix, and when the diameter is adjusted and the systems are freezing, certain porosities on the surface and the hollow spaces in the interior are already formed. However, the increase in the diameter of the porosities shown in the PRSU is apparently greater than that of the porosities exhibited by the PRS; this could be due to the contact time between urea and wheat gluten. According to the literature, with a high contact time between the cross-linking agent and the polymeric material, the porosities tend to expand, i.e., the pores open and increase in diameter [29]. There are three factors that during the development of this material could affect the pore diameter: for the PRSU (1) air entrapment during the combination of the urea solution and wheat gluten, (2) the urea concentration used during the mixing, and (3) the exposure time before

being frozen and lyophilized. The urea solution caused a cross-linking of the polymer chains, whereby interconnecting pores and channels within the system could have been formed. However, at the time of kneading and shaping of the system, the air was trapped in the mixture of gluten and urea. Then, along with the cross-linking time, the polymer chains were more branched and longer. However, this happened around the pores. So, when the water was extracted, the mixture of gluten and urea around the pore did not condense. Finally, the diameter did not decrease [30]. These characteristics are an important part in understanding the behavior of the material. It is possible that through the hollow fraction, the water enters and breaks the interactions between the proteins and urea, and the process ends with the exit of the urea dissolved in water toward the outside of the pastille through the hollow fraction, whether through the pores and their channels or through the micropores. This could expedite the transport of the urea to the outside of the pastille. Xiao et al. [20] prepared a superabsorbent hydrogel based on starch as a prolonged-release fertilizer (PRF). The authors found, through the SEM micrographs, that the material did not present three-dimensional networks, i.e., the presence of hollow parts or pores. However, these characteristics are present once the material swells, which could indicate, in comparison with the pastilles, that it also possesses the ability to absorb water and swell, with the latter behaving as a hydrogel. Nevertheless, the pores and hollow fractions presented in the pastille could increase its diameter and volume and encourage a greater three-dimensional network, compared with its initial state, as has been demonstrated the study by Xiao et al. [20].

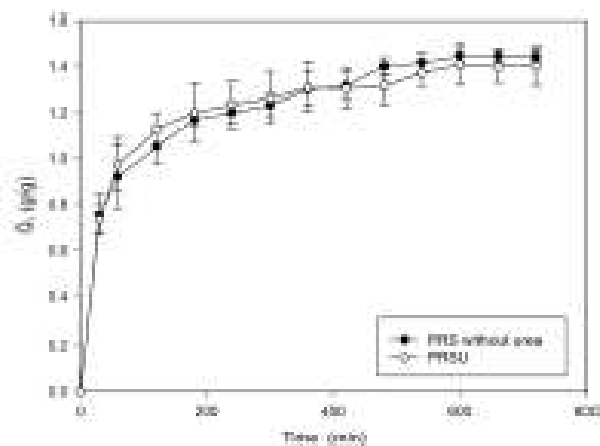


Fig. 4 Kinetics of water absorption of the PR5 and PR5U in distilled water at 25 °C

Kinetics of water absorption

Figure 4 illustrates the kinetics of the PRS and PRSU. The samples revealed rapid water absorption during the first 200 min, while after that time, a gradual swelling occurs until reaching an equilibrium at 600 min. The PRS and PRSU exhibited this behavior, which may be caused by the asymmetric porosity. At the beginning, there was a greater swelling rate, and this decreased until the equilibrium was reached. This behavior is provided by the osmotic pressure, i.e., the higher the osmotic pressure, the faster the water intake rate [27]. Therefore, as the difference in osmotic pressure decreases, the rate of swelling decreases. This behavior is consistent with that reported by Li et al. [27] for a wheat straw superabsorbent material, which showed a rapid swelling rate for the first 50 min, while later a gradual swelling was observed, achieving an equilibrium at 300 min.

On the other hand, the PRS has a water content in the equilibrium of $59.15 \pm 0.55\%$, while the PRSU presents $58.47 \pm 1.50\%$ of water, i.e., both PRS and PRSU have the capacity to absorb and retain water at the equilibrium stage. The water content between both samples presents a difference of 0.68%. This indicates that urea does not exert an effect on the swelling of the PRSU. It is possible that the water content was influenced by the hydrophobic and hydrophilic interactions (given by the aminoacidic composition as prolamins, glutamine, tyrosine, and cysteins), ionic and electrostatic interactions, Van der Waals forces, and mainly hydrogen bonds between the water molecules and the polymer chains, i.e., the polymer chains have the capacity to retain water inside of their structure [31, 32]. Regarding the relation between SEM and water absorption kinetics, it is important to consider that the PRS has smaller pore diameters but a bigger quantity of them compared to the PRSU. However, while PRS presents a greater number of pores, its contact area is bigger than the one in PRSU. This means that the PRS probably has the capacity to retain more g of water per g of dry gluten (Q). The absorption of the solution in the material is based on two characteristic mechanisms which are reported by Zaleski et al. [33]: (1) swelling of the non-porous material which is carried out by the physicochemical interactions between the material and the solvent that the former is in contact with and (2) a capillary condensation that may exist due to the narrowness of the pores that exist in the material given by the polymer walls. Both processes can be carried out at the same time, which influences the absorption of the solution and, in turn, the interaction of the urea with the pore walls of smaller and larger diameter.

It is reported in several works that water absorption between polymer chains is given by the placement of water molecules between the interstitial spaces of polymer chains resulting in the relaxation of these chains [34, 35]. This is favored by the presence of hydrophilic functional groups, such as carboxylic acids (-COOH), carbonyl groups (C=O), -OH groups, and amino groups (-NH₂) [35, 36]. The presence of urea helps to cross-link the polymer chains and prevent their dissolution by the effect of the water molecules present in them [35].

This can lead the PRS and PRSU to absorb and retain water and, at the same time, have the capacity to present the diffusion phenomenon to the outward of

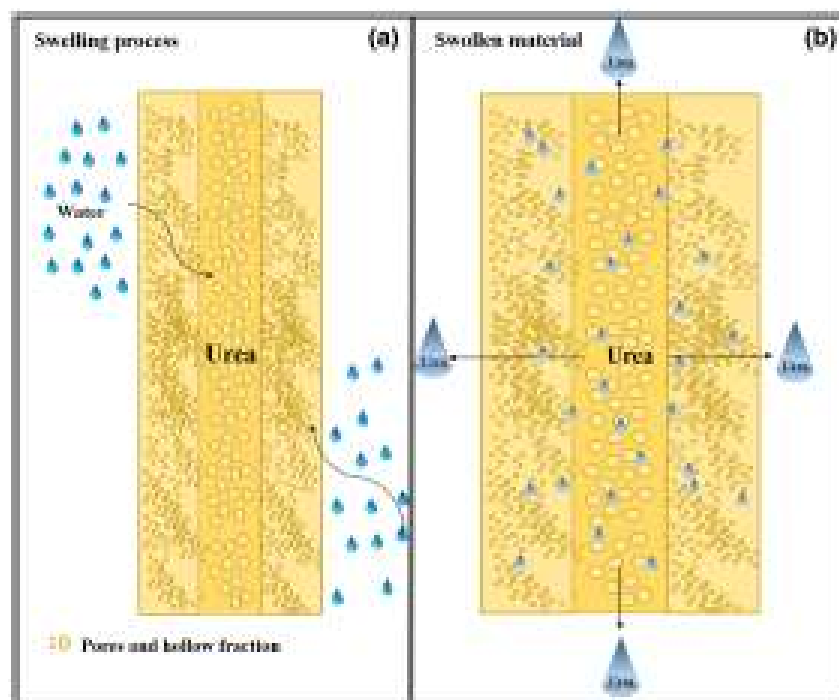


Fig. 5 Schematic diagram of the PRSU water absorption: **a** during the water absorption process, and **b** PRSU with water retention

the PRS and PRSU (Fig. 5). On the other hand, the PRS and PRSU, according to the previously described capabilities, can be classified as materials with swelling capacity. These materials can aid in improving the physical properties of the agricultural soil, retaining water and nutrients, and achieving better soil conditions [37].

Prolonged-release system FT-IR analysis

Figure 6 presents the FT-IR spectrum of wheat gluten (a) and urea (b). The wheat gluten presents a medium intensity band at 1652 cm^{-1} and a weak intensity band at 1535 cm^{-1} , and these bands correspond to the vibrational stretching of amide I (C=O) and the vibration frequency of amide II (N-H), respectively. The urea presents two regions at 3436 cm^{-1} and 3330 cm^{-1} which are characteristics of the primary amine (vibration of the N-H). Also, presents a characteristic strong intensity band of the carbonyl group (C=O) at 1678 cm^{-1} . The bands reported for wheat gluten and urea are the characteristics bands reported by Castro-Enriquez et al. [19] and Barreras-Urbina et al. [38].

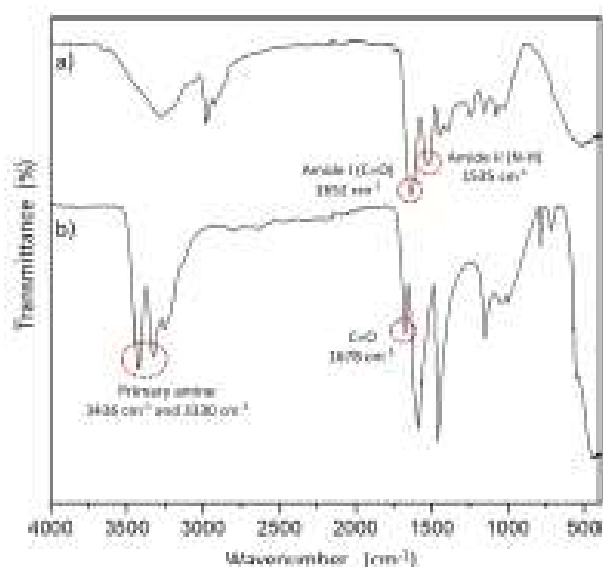


Fig. 6 FT-IR spectrum of the wheat gluten (a) and the urea (b)

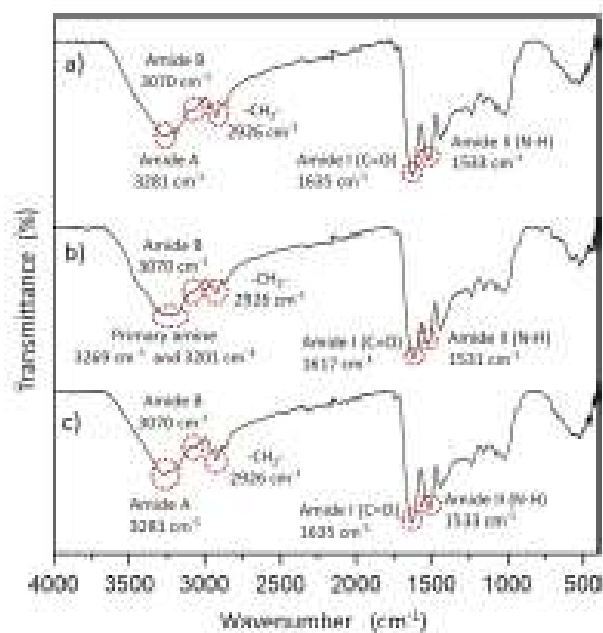


Fig. 7 FT-IR spectrum of the PRS (a), PRSU (b), and PRSU after the urea release (c)

Figure 7 shows the PRS (a), PRSU (b), and the PRS after the urea release (c). The PRS presents a strong intensity band at 1635 cm^{-1} which corresponds to amide I (C=O) and the presence of a medium intensity band at 1533 cm^{-1} which corresponds to the vibrational frequency of the amide II (deformation of the N-H). Also, the PRS presents the stretching of the $-\text{CH}_2-$ group at 2926 cm^{-1} , and the stretching vibration of the N-H of the proteins is given by the presence of the amide A and amide B, which are localized at 3281 cm^{-1} and 3070 cm^{-1} , respectively. These bands correspond to the reported by Zhang et al. [39] which reported the amide A at 3293 cm^{-1} and the stretching vibrations of the N-H and $-\text{CH}_2-$ at 3078 cm^{-1} and 2934 cm^{-1} , respectively. The amide A is localized at $\sim 3270\text{ cm}^{-1}$ to $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$, and amide B (N-H stretching vibration) is a weakly intensity band at $\sim 3030\text{ cm}^{-1}$ to $\sim 3100\text{ cm}^{-1}$, which are characteristics of the proteins [40]. The PRSU presents the bands corresponding to amide I (C=O) and amide II (N-H) at 1617 cm^{-1} and 1531 cm^{-1} . Also, the FT-IR spectrum shows the urea characteristic bands which are two regions in the spectrum at 3269 cm^{-1} and 3201 cm^{-1} , where the primary amine presents a wavenumber displacement. In addition, it is present a displacement of the carbonyl bands for the urea of 61 cm^{-1} and for the PRS of 18 cm^{-1} . This indicates that there is strong interaction through hydrogen bonds between the amino groups of the proteins and carbonyl groups of the urea. Also, these interactions are presented by the carbonyl groups of the wheat gluten and of the amino groups of the urea. The FT-IR bands reported for the PRSU agreed with the bands reported by Castro-Enriquez et al. [19] for gluten and urea, while Robertson et al. [41] reported

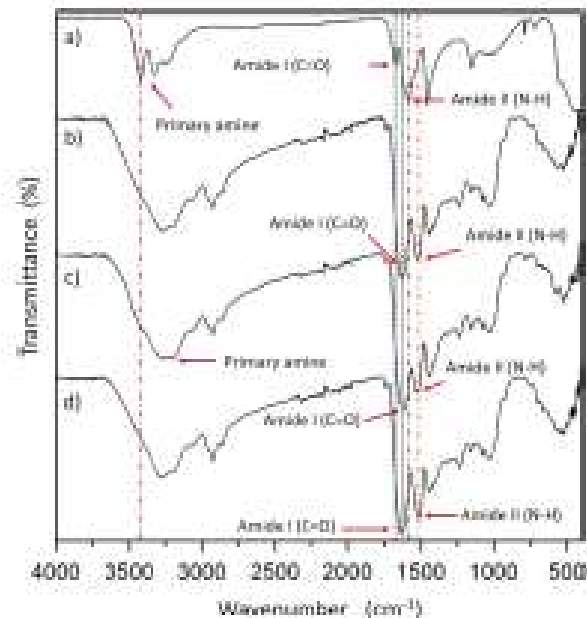


Fig. 8 FT-IR spectrum of the shifted bands of the urea (a), PRS (b), PRSU (c), and PRSU after the urea release (d)

wheat gluten bands that are consistent with these results. PRSU after urea release shows how amide I and amide II returned to their original position, and the sample does not present the two regions of the spectrum that are characteristic for the primary amine. This suggests that the release has been carried out, and therefore, there is no presence of urea in the material after the release. This explanation is consistent with Castro-Enriquez et al. [19], where the amide I (C=O) and primary amide bands returned to their original position after urea release. These results are shown in Fig. 8, where it can be seen in the spectrum the original positions of the wheat gluten and urea characteristic bands, which were shifted due to the interactions between them.

Prolonged-release experiment

Figure 9 presents the urea-release kinetics, in which it can be observed that during the first 30 min, 63.83% of the urea is released. During the first hour, this reaches 69.59% of the urea released, until on reaching the equilibrium at 8 h, the PRSU released 97% of the total urea mixed. This behavior could be due to the fact that during the first h, the water interacted with the urea that was exposed to the outside. The urea, during the procedure to develop the PRSU, is distributed inside and on the surface of the PRSU. The urea that had contact with the water for the first time was the one that was outside. The urea located outside of the pastille was dissolved in water, while the rest of the water continued to enter through the pores and channels of the pastille. The urea present on the outside of the pores is dissolved and begins the diffusion process gradually. The volume and diameters of the pores present in the pastille increase, which expands the space, by which the urea dissolved in water is diffused toward the outside of the pastille. At the same time, swelling of the pastille is carried out, i.e., the swelling process and the release of the urea are carried

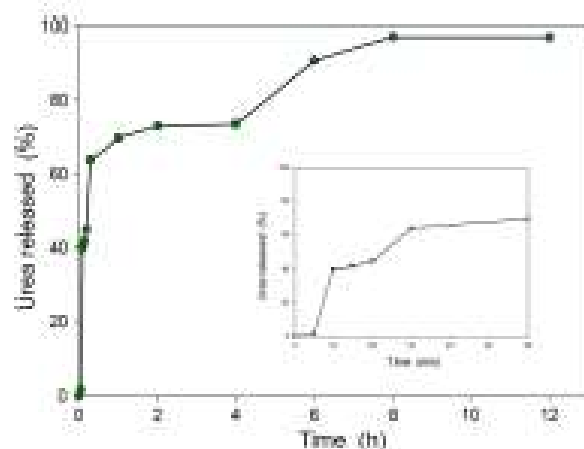


Fig. 9 Urea-release kinetics in water at 25 °C and a neutral pH

out simultaneously, and this behavior according to an industrial swelling material is studied by Nandi and Winter [32]. Therefore, this system, like others composed of wheat gluten, has high release at short times, with a prolonged release on reaching the equilibrium above the 90% release. These results indicate that the PRSU has a prolonged-release behavior, which makes it suitable for its potential application in agricultural crops. On the other hand, the release experiment was carried out with water, but if the pastille is applied in agricultural crops, the behavior could be slower than that predicted in the release experiment, due to the difference of variables such as humidity, temperature, pH, enzyme and microorganism activity, and soil texture [16, 42].

At present, several materials developed from wheat gluten can release urea for a prolonged application in agricultural fields. Castro-Enriquez et al. [19] developed wheat gluten films loaded with urea, in which the potential application was demonstrated of this material in agricultural fields, where release studies revealed that the material possesses a prolonged-release behavior. The equilibrium was reached at 300 min, achieving a release of 98% of the urea trapped in the films, which is equivalent to 55.49 mg. Years later, Barreras-Urbina et al. [38] developed microparticles from wheat gluten proteins soluble in ethanol, where the authors demonstrated through the release study that the microparticles can release 52.80 mg of urea reaching the equilibrium at 720 min, while in this work, the PRSU released 97% at 480 min, which is equivalent to 58.20 mg of urea. The experiments were carried out at 25 °C in distilled water (neutral pH). These results indicate that the PRSU has a better performance compared to the aforementioned membranes and microparticles. This may be related to the quantity of hollow fractions and their asymmetries in the PRSU. Additionally, the PRSU has the ability to absorb and retain water, as shown in previous experiments; thus, this could influence its total release at the equilibrium. This shows that the combination of wheat gluten and urea could be potentially applied as a prolonged-release system of urea.

Tapia-Hernández et al. [22] developed porous wheat gluten microparticles, which exhibited suitable properties, such as their large surface area. With the latter, the authors concluded that the material could have high potential as a prolonged-release system. However, techniques such as nanoprecipitation, emulsion-diffusion, and the electrospray technique utilized for the development of porous wheat gluten microparticles entertain certain disadvantages, such as the use of solvents, high energy expenditure, low yields, and a high production time [26]. This renders it a non-viable option for its application as an alternative in agricultural fields. Wheat gluten pastilles could be a better choice due to their ease of production, short production time, low cost of the raw material and its availability, and the use of low quantities of water as a solvent.

In addition, Xino et al. [20] prepared starch-based superabsorbent polymers (SBSAP) for the slow release of urea. These authors determined the effectiveness of the system as a slow-release system in water. SBSAP system released 15% of the urea in the early stage (0–5 days), while from 5 to 20 days, more than 50% was released. Also, from 20 to 40 days, the SBSAP released more than 80% of urea, with 10% remaining that could still be in the system. At 45 days of the release, the system was disintegrated into much smaller fragments. This study shows that the

are other materials capable to having urea with slow- and prolonged-release behavior. However, this type of process involves greater cost and difficulty compared with the process described herein to make the pastille, due to the chemical modification of the starch, the use of cross-linkers, the use of a mixer and reactor system, and several temperatures during the process. On the other hand, the study with SBSAP takes 1 month to ensure the equilibrium of the release of urea. That could be somewhat unwanted behavior if it was applied in agricultural fields. Due to that irrigation water is available just once or twice a month, depending of the needs of the crops, the plant might not acquire the necessary amount of a nutrient through a system such as SBSAP. Contrariwise, a system as the wheat gluten pastille, which releases urea in a shorter time, at a lower average humidity, could adequately satisfy the amount of nutrients that the plant needs for its development. Also, the wheat gluten-urea system could be applied as the conventional urea, i.e., through the agricultural soil.

Conclusions

Using a simple and practical method, it is possible to obtain a PRSU, taking advantage of the interaction via hydrogen bonds between the carbonyl group of the proteins and the amino group of urea and vice versa. The system showed an asymmetric structure and porosities with micrometric diameters and can be classified as a material with water absorption and retention capacity. Finally, the system revealed a prolonged release of urea in water at the laboratory experiments; therefore, the PRSU obtained could be a suitable alternative for the application of an ecofriendly material that can achieve better agronomic practices.

Acknowledgments The authors appreciate the economic support given by CONACYT, through the project of basic sciences I78436, and the Universidad de Sonora. Carlos G. Barreras-Urbina, José Agustín Tapia-Hernández, and Daniela D. Castro-Ferriz thank CONACYT for the granted scholarship.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

1. Gong J, Sun Y, Zhang M, Li C, Yang Y, Liu Z, Li S (2015) Long-term effects of controlled release urea application on crop yields and soil fertility under rice-oilseed rape rotation system. *Field Crops Res* 184:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.09.003>
2. Edrisi A, Manzori Z, Dabir B (2016) Urea synthesis using chemical looping process—Techno-economic evaluation of a novel plant configuration for a green production. *Int J Greenhouse Gas Control* 44:42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2015.10.020>
3. Koohostanian H, Sadeghi J, Mohabbati-Kalbari D, Shahraki F, Samimi A (2018) A novel process for CO₂ capture from the flue gases to produce urea and ammonia. *Energy* 144:279–285. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.12.034>
4. Li P, Lu J, Wang Y, Wang S, Hazrat S, Ren T, Cong R, Li X (2016) Nitrogen losses, use efficiency, and productivity of early rice under controlled-release urea. *Agric Ecosyst Environ* 231:78–87. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.09.020>

Anexo 2

The effect of a prolonged release system of urea on nitrogen losses and microbial population changes in two types of soil from Northwestern of Mexico

Barreras-Urbina C.G.^a, Pérez-Tello M.^b, Plascencia-Jatomea M.^a, Ledesma-Osuna A.I.^a,
Wong-Corral F.J.^a, Cárdenas-López J.L.^a, Tapia-Hernández J.A.^a, Castro-Enríquez Daniela
D.^a and Rodríguez-Félix F.^{a*}

^a Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), Universidad de Sonora,
Hermosillo, Sonora, 83000 Mexico

^b Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo,
Sonora, 83000 Mexico

*Corresponding author e-mail address: rodriguez_felix_fco@hotmail.com

Abstract

Urea is the nitrogen-containing fertilizer most used in the agricultural fields and is considered the main limiting plant- growth factor in agricultural soils. Urea is transformed by urease enzyme and environmental conditions into nitrates, nitrites, and ammonium. However, such species are lost into the environment, where they may cause pollution issues in the groundwater, agricultural soil, and the atmosphere. The aim of this investigation was to determine the effect of a prolonged release system of urea (PRSU) as a device to reduce the loss of nitrates and ammonium and the variability of the microbial population of native micro-organisms. The application of PRSU causes a beneficial effect on the physicochemical

composition of agricultural soils textures, as loam and loamy-sandy-clayey textures from the Agricultural and Livestock Department of the University of Sonora (ALDUS) and Valley of Empalme (VE), mainly maintaining organic matter, pH, and nitrates content. During the first irrigation, the PRSU showed a decrease of nitrate and ammonium losses of 73.75% and 63.33%, respectively, for VE soil, while the decrease in nitrate loss for the ALDUS soil was 84.02% and ammonium was 24.91% during the first irrigation. During the second irrigation, the reduction of nitrate losses was 46.23% and 100% for ammonium in VE soil, while for ALDUS soil, there was a reduction of 27.32% for nitrates and 87.94% for ammonium. In addition, the microbial population of the soil increased after the application of the PRSU. Where, for VE soil, there was an increase from 11,500 CFU/g.d.s. to 100,000 CFU/g.d.s. and for ALDUS soil, it was from 6,800 CFU/g.d.s. to 60,000 CFU/g.d.s. Also, PRSU did not present total degradation under environmental conditions after its application on agricultural land. It was concluded that both soil textures presented the same loss-reduction pattern, increasing the quality of the soil and the microbial population after the PRSU application. This evidence indicates that PRSU may be an alternative of fertilization to decrease nitrogen losses into the environment and achieve the decrease of the environmental pollution.

Keywords: Prolonged release system, urea, nitrates, ammonium, microbial population.

1. Introduction

Nitrogen is an essential nutrient for food production in agricultural fields due to that it is an important factor for suitable plant growth (Scott et al. 2015). Urea is one of the nitrogen-based fertilizers most widely used. Its use is estimated at 70 million metric tons per year, and may be doubled by the year 2050 (Davis et al. 2016). Current, fertilizer application practices

show limitations, as a result, the nitrogen is not utilized by the plant, this leads to significant loss of nutrient to the environment (Naz and Sulaiman 2016). The efficiency of nitrogen fertilizers such as urea ranges from 30% to 40%, which indicate that the rest is lost to the environment by biogeochemical processes such as ammonia (NH_3) volatilization, nitrate (NO_3^-) leaching, and the loss of nitrous oxide (N_2O) into the atmosphere (González et al., 2015; Liu et al., 2015).

Urea is transformed to ammonium carbonate ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) in the presence of the urease enzyme and water. The ammonium carbonate undergoes an ammonification process to obtain the ammonium (NH_4^+) (Cameron et al., 2013; Azeem et al., 2014). Then, the nitrification process is carried out, which is a reduction of the ammonium, in which ammonium oxidizing bacteria associated with the ammonium monooxygenase enzyme for the production of nitrites (NO_2^-) are involved (Cameron et al., 2013; Azeem et al., 2014). The transformation of nitrites into nitrates (NO_3^-) is catalyzed by the bacterium belonging to the genus *Nitrobacter* (Cameron et al. 2013). Considering that the nitrate is a suitable nitrogen form for the plants, this process is beneficial for plant growth.

However, at low oxygen concentrations and in the presence of facultative anaerobic microorganisms, nitrates are transformed into molecular nitrogen and nitrous oxide that are lost to the atmosphere by volatilization (Azeem et al. 2014). In turn, the ammonium produced enters the nitrification process, and a certain part of it, under basic pH conditions of the agricultural soil and the presence of the enzyme urease, is converted into ammonia, which is easily volatilized. Recent studies have found that anaerobic ammonium oxidation (anammox)

through autotrophic anammox bacteria can oxidize the ammonia directly into molecular nitrogen without the release of nitrous oxide to the environment (Wang et al. 2017).

During the processes described previously, nitrogen forms are easily lost into the environment, including NO_3^- and NH_4^+ , which are absorbed by the plant for suitable nutrition, whereby the loss of nitrogen leads to an inefficiency in its use, reduction of biomass, environmental pollution, decrease in the yields, low-quality products, and consequently, economic problems for farmers (Naz and Sulaiman, 2016; Asif et al., 2018).

Currently, the use of prolonged release systems has been studied as an alternative to avoid environmental damage, decrease economic losses, and increase quality products (Barreras-Urbina et al. 2018). For the agricultural applications of these systems, they are required to be biodegradable and ecofriendly. Wheat gluten is one of the most important natural polymers in the agri-food industry. It is economical, biodegradable, and biocompatible, as well as being easily obtainable as a by-product from the isolation of starch (Joye et al., 2015; Tapia-Hernández et al., 2018).

Castro-Enríquez et al. (2012) developed wheat gluten membranes loaded with urea and determined the effectiveness of gluten as a matrix for retention and subsequent urea release.

Barreras-Urbina et al. (2018) developed microspheres loaded with urea by the nanoprecipitation process. The authors showed the potential application of this wheat gluten system for the release of urea into agricultural fields. Castro-Enríquez et al. (2019) developed microparticles of wheat glutenins by the electrospray method. The authors conducted the physicochemical characterization and found suitable results to suggest the potential

application of glutenin microparticles as a controlled release system of urea. In recent years, [Gao et al. \(2015\)](#), used a coated urea polymer and coated urea sulfur, and the authors measured the effectiveness of the release system in agricultural soils.

While, several investigations have been conducted, there are no reports on a similar system to reduce nitrogen losses into the environment. Current studies have been focused on the development of materials with barrier function to decrease water contact, which leads to prolonged release. [Li et al. \(2017\)](#) tested three types of controlled release systems of urea (CRU) in order to test their effectiveness. The authors explain that several materials for the development of these systems have been employed, such as polyurethane and water-based polymer coatings. However, the authors utilized three types of CRU and concluded that CRU reduce nitrogen losses through NH_3 volatilization, these CRU maintaining the rice yields. [Li et al. \(2018\)](#) evaluated the application of polymeric coating urea (PCU). The authors found that on using a coating of urea in comparison with the conventional urea treatment, it is possible to decrease $\text{NH}_4\text{-N}$ in water, also maintaining and increasing the rice yields of rice and N uptake by the plants. However, it has been reported that several coated materials, such as slow-release fertilizers and controlled-release fertilizers present, low availability of nitrogen; in addition, these systems are affected by temperature and microbial activities ([Morgan et al. 2009](#)).

Currently, the development of these systems is important to avoid environmental issues, due to the fact that N losses from agricultural soils comprise one of the main pollutant from agricultural practices worldwide which gives rise to issues such as water and soil eutrophication, these losses are related with the "greenhouse" effect ([Qiao et al., 2014](#); [Wang](#)

et al., 2016; LeMonte et al., 2016). The aim of this research was to study the effectiveness of PRSU to reduce N losses, the effect on both agricultural soil textures located in the State of Sonora, Mexico, and to discuss its relation with the microbial population and PRSU biodegradability under environmental conditions.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of the Prolonged Release System of Urea (PRSU)

The PRSU was prepared using 0.55 g of commercial wheat gluten (Rockette) mixed with urea (Fagalab) solution 1M, the samples were frozen and then lyophilized. The specific methodology of the preparation and characterization is under review for a possible publication.

2.2 Sampling and the physicochemical properties of agricultural soil

The experiments were carried out using two types of agricultural soils from different locations of the state of Sonora, Mexico: 1) Valley of Empalme (VE) (28°08'21.0"N 110°41'43.9"W), and 2) experimental fields in the Agricultural and Livestock Department of the University of Sonora (ALDUS) ((Km 21 toward to the Coast of Hermosillo (29°00'52.5"N 111°08'03.9"W)). The soils from both locations were sampled using a diagonal sampling method according to the Official Mexican Standard (NOM-021-SEMARNAT-2000). Twenty-five samples were collected for each soil location from a depth ranging from 25-30 cm. After this, the samples were thoroughly mixed to form a single sample for each location and their physical and chemical properties were determined.

2.3 Leaching experiment and nitrogen losses

A statistical design in randomized complete block (VE and ALDUS soils) with three treatments was used (Fig. 1); 1) PRS (150 kg N ha^{-1}); 2) 150 kg N ha^{-1} , and 3) unfertilized soil. Each treatment was performed by triplicate. In this experiment, 18 perforated containers for leaching were placed in the agricultural field; nine recipients contained soil from ALDUS, and the remaining nine recipients contained agricultural soil from VE. Both soil samples were mixed separately before being set in place. Soil samples from both locations, that is, ALDUS and VE, were homogenized and placed using a soil bed depth of 30 cm, while the conventional urea and the PRSU was placed at a depth of 5 cm from the soil surface. The first irrigation was applied using an irrigation lamina of 24 cm, while the second irrigation was applied utilizing an irrigation lamina of 12 cm. After each irrigation, the leachate was collected in recipients placed under the perforated containers and was thoroughly mixed to obtain a single sample of each treatment per block. The samples were slurried in closed plastic containers for further NO_3^- and NH_4^+ contents analysis.

The nitrates (NO_3^-) were determined using the cadmium reduction method, and ammonium (NH_4^+) was determined using the Nessler method. Measurement of each analyte was carried out using a multiparameter photometer (Hanna Instruments, HI83200) and using a kit (Hanna Instruments) for nitrate and ammonium determination. The environmental conditions, such as average temperature of 20.11°C , an average relative humidity of 55.52%, and an average precipitation of 0.43 mm, presented during the experiment according to the Automatic

Meteorological Station of Sonora. Reduction of the nitrogen losses (NO_3^- and NH_4^+) was calculated in the leachates by the subtraction of the soil nitrogen losses from the 0 kg N ha^{-1} to the 150 kg N ha^{-1} and PRSU treatments (Fig. 2).

The calculated values were obtained using the equations 1, 2, 3, and 4, using as reference the Fig.2.

$$LixUr_{\text{Nitrates}} = 1B - 1A \quad \text{Eq. (1)}$$

$$LixUr_{\text{Ammonium}} = 2B - 2A \quad \text{Eq. (2)}$$

$$LixPRSU_{\text{Nitrates}} = 1C - 1A \quad \text{Eq. (3)}$$

$$LixPRSU_{\text{Ammonium}} = 2C - 2A \quad \text{Eq. (4)}$$

Where: $LixUr_{\text{Nitrates}}$ are the nitrates values of the 150 kg N ha^{-1} treatment leachates, $LixUr_{\text{Ammonium}}$ are the ammonium values of the 150 kg N ha^{-1} treatment leachates, $LixPRSU_{\text{Nitrates}}$ are the nitrates values of the PRSU treatment leachates, and $LixPRSU_{\text{Ammonium}}$ are the ammonium values of the PRSU treatment leachates.

Then, the losses of the PRSU treatment was determined based on the losses exhibited in the urea treatment. With the latter, we are able to take the reduction of losses of nitrates and ammonium as expressed in percentages. These calculations were made using the following equations (Eq. 5 and Eq. 6):

$$\% LixPRSU_{\text{Nitrates}} = \frac{LixPRSU_{\text{Nitrates}}}{LixUr_{\text{Nitrates}}} (100) \quad \text{Eq. 5}$$

$$\% \text{LixPRSU}_{\text{Ammonium}} = \frac{\text{LixPRSU}_{\text{Ammonium}}}{\text{LixUr}_{\text{Ammonium}}} (100) \quad \text{Eq. 6}$$

Where:

$\% \text{LixPRSU}_{\text{Nitrates}}$ is the percentage of leached nitrates from the PRSU treatment.

$\text{LixPRSU}_{\text{Nitrates}}$ is the nitrates leached from the PRSU treatment.

$\text{LixUr}_{\text{Nitrates}}$ is the nitrates leached from the 150 kg N ha⁻¹ treatment.

$\% \text{LixPRSU}_{\text{Ammonium}}$ is the percentage of leached ammonium from the PRSU treatment.

$\text{LixPRSU}_{\text{Ammonium}}$ is the ammonium leached from the PRSU treatment.

$\text{LixUr}_{\text{Ammonium}}$ is the ammonium leached from the 150 kg N ha⁻¹ treatment.

2.4 Microbiological analysis

Microorganism isolation was performed using the methodology reported by [Vital-López et al. \(2015\)](#). The soil sample to be analyzed was sieved through a mesh with a pore size of 2 mm. The soil was suspended in saline solution (0.85% w/v) and serial dilutions were carried out from 10⁻¹ to 10⁻⁶ with saline solution (0.85% w/v). After this, Ashby-Mannitol Agar was prepared for the growth of the microorganisms. The cultures were incubated from 4-5 days at 37°C using an incubator (Thermolab model TE-I45DM). The colony-forming unit per gram of dry soil (CFU/ g.d.s.) were quantified and the observation of the macroscopic and microscopic characteristics of the colonies was conducted with Gram staining using a Binocular Microscope Olympus (model CX31RTSF) with an Infinity 1 Olympus camera (model U-CAMD3/U-TV1X-2 mounting adapter, Japan). Also, the similar colonies between both soil samples ALDUS and VE were isolated and the similar microorganism (GMI) was used to show the effect of the PRSU on the microbial population.

2.4.1 Fluorescence microscopy

The prolonged release system of urea (PRSU) was tested to determine its capacity to maintain microorganism viability. The PRSU was inoculated with the GMi that was found in both soils samples and that presented similar macroscopic and microscopic characteristics. The microorganism sample that grew in Ashby-Mannitol Agar was inoculated into nutritious broth and incubated from 24-48 h in an incubator (Thermolab model TE-I45DM). Afterward, 20-50 μ L of nutritive broth were taken inoculated into the PRSU, the sample was added to the PRSU, and it expanded and entered into the system. The PRSU was incubated from 24 to 48 h; then it was stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). The viability of the microorganisms on the PRSU was observed using an inverted microscope (Leica Microsystems CMS GmbH Model DMi8, USA) with a fluorescence filter (DAPI excitation 350/50 filter and emission 460/50 filter) and a cooled chamber DFC 450C (Leica). The images were processed using the Overlay of fluorescence software (LAS AF version 3.1.0, Leica Microsystem, USA) (Hernández-Téllez et al. 2018).

2.5 Statistical analysis

Descriptive statistics (means and standard deviations) were utilized for the data obtained from the leachates. Also, for the leachates, an analysis of variance (ANOVA) was performed with a level of reliability of 95%. Tukey test ($p \leq 0.05$) was used to determine significant differences between the treatments and the type of soils analyzed.

3. Results and Discussion

3.1 Agricultural Soils' Physicochemical Properties

Table 1 presents the physicochemical properties of the soils before the application of each treatment: 0 kg N ha⁻¹; 150 kg N ha⁻¹, and PRSU. Both ALDUS and VE soils presented different textures, which could be classified according to the textural diagram from the United States Department of Agriculture (USDA) as loam texture for ALDUS soil and loamy-sandy-clayey texture for VE soil. The soil with the loamy-sandy-clayey texture exhibits a high nitrate content (NO₃⁻), probably due to the livestock activities and crop experiments in the fields. The physicochemical properties from both soils can be considered suitable characteristics for crop development.

Table 2 shows the physicochemical properties after each fertilization treatments, where the VE soil do not change its texture due to an effect of the treatments, maintaining its loamy-sandy-clayey texture. The treatment with PRSU reveals a high content of NO₃⁻ in comparison with that of the 150 kg N ha⁻¹ treatment, with the characteristics present in both soils' textures. In both situations, this behavior could be due to the PRSU. It is probable that, during irrigation, the soil was washed, and the nitrates lost were those already contained in the soil in their natural form. However, the high content of NO₃⁻ in the PRSU treatments reveals the prolonged release of urea behavior, i.e., the urea released was transformed through biogeochemical process into NO₃⁻, which are detectable after the PRSU application, the latter

possibly a suitable condition due to the enrichment of the agricultural soil. In addition to the contribution of nitrogen, the PRSU contributes organic matter.

Nevertheless, the organic matter in these results does not exhibit differences: i.e., the urea treatment presented organic matter similar to the PRSU treatment. This characteristic could increase the organic matter from the PRSU if the system had been completely degraded, while the urea treatment cannot increase the organic matter due to it does not possess the material necessary such as the PRSU. This indicates that the PRSU may be applied in crops involving 5 to 6 months of growing time. The PRSU would be able to maintain and increase the soil's organic matter, mainly providing components such as C and N, regardless of the cultivation developed and the risks applied. With these characteristics, the PRSU would provide, after harvest, the necessary components (from wheat gluten proteins) to benefit the agricultural soil before the sowing of any crop. During the application of long-term nitrogen in agricultural fields, acidification of soils is promoted, which comes to affect soil degradation, fertility, and productivity. Furthermore, these changes has an effect on the microbial activity which is affected by pH changes (Dai et al. 2018). However, in this study, although there is a high nitrate content after the application of the PRSU, the latter does not present acidification of the soil, maintaining the pH at around 7, which is optimal for the microbial activity and the development of cereals such as wheat.

3.2 Nitrogen losses

The measurement of NO_2^- values showed results with unreliable values. It has been reported that the oxidation of NO_2^- into NO_3^- by the action of *Nitrobacter* is carried out rapidly. Therefore, an accumulation of nitrites in agricultural soils is not common (Cameron et al. 2013). Fig. 2a shows NO_3^- and NH_4^+ losses during the first irrigation for the three treatments in both soil textures (ALDUS and VE). Both soils VE and ALDUS presents significant differences between each treatment, which can be explained as due to the particle sizes are in different in the composition in every soil texture. The nitrate leachates obtained for all treatments from ALDUS soil presented lower values in comparison with those of VE soil due to variation in particle size. These characteristics have an effect on the water filtration and on the drag of nitrates, i.e., the difference in particle size gives rise to the spaces between them; thus, at a certain depth, the leachate advances more quickly. The amounts of leachate for 150 kg N ha⁻¹ treatments demonstrated a high value in comparison with the PRSU treatments. Because the urea applied in a conventional manner is in direct contact with the water, its solubility properties cause quick dissolution through the soil, while the PRSU presented a polymeric barrier conferred by the wheat-gluten proteins that avoided the rapid dissolution of urea into the aqueous phase. With this, the urea decreases its transport through the system to reach the outside of the PRSU and also, it is not completely available for its use in the nitrogen biogeochemical process in the soil. Based on these results, the efficiency of the PRSU to reduce nitrates losses during the first irrigation was 73.75% for VE soil, while for ammonium, this was 63.33%. The PRSU efficiency of nitrates in ALDUS soil was 84.02%, while for ammonium, this was 24.91%. Fig. 2b presents the nitrate and ammonium losses through leaching during the second irrigation for both soils. It can be observed that, for 0 kg N ha⁻¹ treatments, there are significant differences in the nitrate and ammonium

losses by the soil texture effect. The 150 kg N ha⁻¹ treatment did not present significant differences in the leaching of nitrates between both soils; however, in comparison with the first irrigation, ALDUS soil presented an increase in the amount of nitrates. This may be due to the oxidation of nitrites into nitrates by microbial activity and also, to the environmental conditions; i.e., nitrogen is an element that can be fixed from the atmosphere. Additionally, the texture of ALDUS soil favors greater retention of nutrients and water because its structure is heterogeneous compared with the VE soil. The ammonium that was leached showed significant differences due to the effect of the agricultural soil texture. The PRSU treatment revealed significant differences due to soil texture, in which it can be observed that the leachate value is lower than that of the 150 kg N ha⁻¹ treatment, due to the prolonged release effect that the system presents. This effect is caused by the polymer matrix in which the urea molecules are trapped. The urea interactions via hydrogen bonds with the reactive groups from the wheat gluten proteins (Castro-Enríquez et al., 2012; Barreras-Urbina et al., 2018). Based on present results, it can be deduced that the effectiveness of the PRSU for nitrates during the second irrigation for the soil from VE was 46.23%, while for the ammonium, this was 100%. The PRSU efficiency of nitrates for ALDUS soil was 27.32%, while for ammonium, this was 87.94%.

The results indicate that PRSU presented a lower amount of ammonium, and the nitrate value was higher for both soils. In addition, the pH of the soils was maintaining at close to 7 (Tables

1 and 2) for nitrification to take place, causing a lower amount of ammonium in the soil, and with this, a greater amount of nitrates. When the content of ammonium was low, the microbial activity that is related to nitrification is not affected. However, when there are high amounts of ammonium in the soil, there is a change in pH and microbial activity such as that of *Nitrobacter* is affected, an explanation reported in the scientific literature that helps corroborate what is found in this study (Cameron et al. 2013).

Gao et al. (2015) applied a controlled release system of urea in a potato crops. Where the authors obtained a nitrogen use efficiency (NUE) of 87.8-169.4% and 108.3-226.4%, using polymer controlled urea (PCU) and polymer sulfur controlled urea (PSCU) systems. However, the authors do not specify the reduction of losses in an experiment without plants to determine the efficiency of the system in terms of reducing losses. In our study, prior to applying it to plants, we decided to use a leaching experiment to determine, without any other variable, the capacity of the system to reduce losses compared to the urea treatment. These results indicated that the system has the capacity to reduce N losses. According to Shibata et al. (2017), the term nitrogen use efficiency (NUE) may be applied to agricultural practices including the manner of fertilization. The system applied in this research may improve the NUE focused on the reduction of nitrogen losses. It is important to consider that the PRSU was applied only once during the experiment. This is an advantage compared to conventional fertilization practices. Considering that PRSU is a prolonged release fertilizer, it is desirable that it provides the nutritional needs to the plant in a single application during the plant growth cycle (Azeem et al. 2014). Fig. 4 presents a schematic description of N losses during the first and second irrigations; in addition, the nitrogen cycle is provided to understand the N-form transformation from the urea application in the soils.

3.3 Microbiological Analysis

Figs. 5A and 5B) show the microbial communities in both VE and ALDUS soils. Diverse microbial communities were observed with fungal and bacterial colonies before and after treatments. This may be due to the soils of Northwest Mexico, which are from arid lands and that these types of microorganisms are characteristic, considering that the samples were from agricultural soils. The low levels of humidity in the soil, caused by the high temperatures during most of the year, promotes the growth of mainly fungal. However, the development of transparent, convex, and flat colonies in both soils can be observed. Fig. 5C shows the isolated colonies described, which are similar for both soils, the latter presenting a combination of negative and positive bacilli through Gram staining. Ashby-Mannitol Agar is considered a specific culture medium for *Azotobacter* spp., which is classified as a plant growth promoter. This is because it promotes the nitrogen fixation, the solubilization of minerals, and phytohormone production (Bandopadhyay and Das 2017). The growth of a strain with the similar characteristics in both soils is reasonable because the soils derive from agricultural soils of the same region and are used for the development of crops.

CFU/g.d.s. for VE soil were 11,500 CFU/g.d.s. initially and, after the application of the system, increased to 100,000 CFU/g.d.s, while ALDUS soil was initially 6,800 CFU/g.d.s. and, after the application of the system, increased to 60,000 CFU/g.d.s. The variation of the microbial communities provides by the effect of the PRSU, and it was obtained based to the

increase of CFU/g.d.s. These results suggest that, while PRSU is in agricultural soil, microorganisms such as *Nitrobacter* spp. and *Azotobacter* spp., among others, may be taking advantage of the organic matter, mainly wheat gluten, in order to increase its population, in turn intervening in the nitrification process. The results discussed in Section 3.2 are consistent with the increase in the microbial population, considering that the populations of *Nitrobacter* and *Azotobacter* were increased. The former was evidenced by the high content of nitrates found after the application, and the latter, by its growth in a specific culture medium and its characteristics. PRSU, based on the wheat-gluten and urea applied in agricultural soil, can increase the microbial communities and effect the biochemical nitrogen process and form metabolites, thus aiding in microorganism growth and plant nutrition. However, these tests exhibit the effect of PRSU on microbial communities, that is, an important factor in plant growth.

3.3.1 Fluorescence Microscopy

Figs. 6A1 and 6A2 show the fluorescent images of the PRS without urea. Clumps of microorganisms can be observed on the surface of the system. The images show a porous structure, while in Figs. 6B1 and 6B2, we are able to observe the pores with an increased diameter and clumps of viable microorganisms can be observed around the pores. These characteristics could be given the organic characteristics of the system due to its composition. The pores on the structure facilitate water entry into the system, and the microorganisms take advantages of the empty spaces to create suitable niches for their growth process. Also, it has been reported that several microorganisms that are plant growth promoters require growth under aerobic conditions (Kennedy et al. 2015). Additionally, the advantages of the increase of this type of microorganism lies in the production of several types of nitrogenase enzymes,

which aids in nitrogen fixation, and with this, the production of phytohormones and necessary compounds for promoting plant growth (Setubal et al. 2009).

The PRSU effect on the microbial communities may benefit the interactions between plant and the microorganisms. This effect provides suitable nutrition for the plant by interaction in the mycorrhizas, which could help with the fixation of nutrients that are not easily assimilated by the plant, also facilitating correct N nutrition from organic sources (Kuzyakov and Xu 2013). Zeng et al. (2016) reported that nitrogen fertilization affects the bacterial diversity of the soil due to the enrichment of the soil with N, which leads to soil acidification. This causes a change in the soil pH, which hinders for the growth of micro-organisms. However, in this research work, we can observe the increase of nitrogen-fixing micro-organisms and plant growth promoters, monitored by means of a specific culture medium. At the same time, we observe that PRSU favors its growth and the amount of organic matter. Therefore, we could assume that the PRSU, according to our results, could be of benefit to agricultural soil, nitrogen fixation, and the microorganism-plant relationship.

3.4 PRSU Degradation Under Environmental Conditions

Fig. 7 shows the PRSU after application in both soils (VE and ALDUS). Figs. 7A1 and 7A2 present the images of the system mixed with agricultural soil, where it can be observed that part of the system was intact after the test period. Figs. 7B1 and 7B2 show the same effect: the system proved its capability to resist the biodegradability of the environment, i.e., it was not completely affected by the soil environmental conditions. The degradability of the

material could be influenced by several factors, such as soil humidity, temperature, but mainly its biological activities (Zhou et al. 2015).

These results indicated to us that PRSU possesses the capacity to resist the environmental conditions from the agricultural soil of the Northwest of Mexico. We could also deduce that the PRSU could provide organic matter, and perhaps could maintain the release of urea until the complete degradation of the material.

4. Conclusion

The application of PRSU proved to produce beneficial changes in the agricultural soils, maintaining organic matter, increasing nitrate content without changes in the pH. In turn, it presented beneficial changes in the microbial communities, promoting the growth of nitrogen-fixing populations and plant growth promoters. The PRSU achieved a considerable reduction of nitrogen losses through leaching, therefore, potential improvement to the environment. The information obtained in this investigation can aid to promote a novel alternative to fertilization in agricultural fields using a PRSU based on wheat gluten and urea, which is able to maintain a balance in the agroecosystem of soils and, in turn, reduce the contamination caused by conventional practices of nitrogen fertilization cause on the carrying out of sustainable agronomic practices.

Declarations of conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest

Acknowledgments

The authors appreciate the economic support of the CONACYT through the Project of Basic Science 178436, and the Universidad de Sonora. Carlos G. Barreras-Urbina, José A. Tapia-Hernández, and Daniela D. Castro-Enríquez thank CONACYT for the scholarships granted.

References

- Asif M, Tunc CE, Rehman R, et al (2018) Effect of predicted climate change on growth and yield performance of wheat under varied nitrogen and zinc supply. *Plant Soil* 434:231–244. doi: 10.1007/s11104-018-3808-1
- Azeem B, Kushaari K, Man ZB, et al (2014) Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer. *J Control Release* 181:11–21. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.02.020
- Bandopadhyay A, Das N (2017) Plant growth promoting microbial consortial formulations mediated biological control of stem and root rot disease of Jute caused by *Macrophomina phaseolina* ((Tassi .) Goid. 20:
- Barreras-Urbina CG, Tapia-Hernández JA, Castro-Enríquez DD, et al (2018) Microparticles from Wheat-Gluten Proteins Soluble in Ethanol by Nanoprecipitation: Preparation, Characterization, and Their Study as a Prolonged-Release Fertilizer. *Int J Polym Sci* 2018:1–10. doi: 10.1155/2018/1042798
- Cameron KC, Di HJ, Moir JL (2013) Nitrogen losses from the soil/plant system: A review. *Ann Appl Biol* 162:145–173. doi: 10.1111/aab.12014
- Castro-Enríquez D-D, Castillo-Ortega M-M, Romero-García J, et al (2019) Development of microparticles from wheat glutenins by electrospray and potential application as controlled-release fertilizers. *Bull Mater Sci* 42:1–9. doi: 10.1007/s12034-018-1716-x
- Castro-Enríquez DD, Rodríguez-Félix F, Ramírez-Wong B, et al (2012) Preparation,

- characterization and release of urea from wheat gluten electrospun membranes. *Materials (Basel)* 5:2903–2916. doi: 10.3390/ma5122903
- Dai Z, Su W, Chen H, et al (2018) Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. *Glob Chang Biol* 24:3452–3461. doi: 10.1111/gcb.14163
- Davis AM, Tink M, Rohde K, Brodie JE (2016) Urea contributions to dissolved “organic” nitrogen losses from intensive, fertilised agriculture. *Agric Ecosyst Environ* 223:190–196. doi: 10.1016/j.agee.2016.03.006
- Gao X, Li C, Zhang M, et al (2015) Controlled release urea improved the nitrogen use efficiency, yield and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) on silt loamy soil. *F Crop Res* 181:60–68. doi: 10.1016/j.fcr.2015.07.009
- González ME, Cea M, Medina J, et al (2015) Evaluation of biodegradable polymers as encapsulating agents for the development of a urea controlled-release fertilizer using biochar as support material. *Sci Total Environ* 505:446–453. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.10.014
- Hernández-Télliz CN, Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández A, et al (2018) *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 17:897–912. doi: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n3/Hernandez
- Joye IJ, Nelis VA, McClements DJ (2015) Gliadin-based nanoparticles: Fabrication and stability of food-grade colloidal delivery systems. *Food Hydrocoll* 44:86–93. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.09.008
- Kennedy C, Rudnik P, McDonald ML, Melton T (2015) *Azotobacter*. *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*
- Kuzyakov Y, Xu X (2013) *Frontiers on bone marrow transplantation: fetal hematopoiesis*.

New Phytol 198:656–669. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.12235>

LeMonte JJ, Jolley VD, Summerhays JS, et al (2016) Polymer coated urea in turfgrass maintains vigor and mitigates nitrogen's environmental impacts. PLoS One 11:1–13. doi: [10.1371/journal.pone.0146761](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146761)

Li P, Lu J, Hou W, et al (2017) Reducing nitrogen losses through ammonia volatilization and surface runoff to improve apparent nitrogen recovery of double cropping of late rice using controlled release urea. Environ Sci Pollut Res 24:11722–11733. doi: [10.1007/s11356-017-8825-8](https://doi.org/10.1007/s11356-017-8825-8)

Li P, Lu J, Wang Y, et al (2018) Nitrogen losses, use efficiency, and productivity of early rice under controlled-release urea. Agric Ecosyst Environ 251:78–87. doi: [10.1016/j.agee.2017.09.020](https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.09.020)

Liu TQ, Fan DJ, Zhang XX, et al (2015) Deep placement of nitrogen fertilizers reduces ammonia volatilization and increases nitrogen utilization efficiency in no-tillage paddy fields in central China. F Crop Res 184:80–90. doi: [10.1016/j.fcr.2015.09.011](https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.09.011)

Morgan KT, Cushman KE, Sato S (2009) Release mechanisms for slow- and controlled-release fertilizers and strategies for their use in vegetable production. Horttechnology 19:10–12

Naz MY, Sulaiman SA (2016) Slow release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: A review. J Control Release 225:109–120. doi: [10.1016/j.jconrel.2016.01.037](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.037)

Qiao C, Greaver TL, Compton JE, et al (2014) How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. Glob Chang Biol 21:1249–1257. doi: [10.1111/gcb.12802](https://doi.org/10.1111/gcb.12802)

Scott JT, Lambie SM, Stevenson BA, et al (2015) Carbon and nitrogen leaching under high

- and low phosphate fertility pasture with increasing nitrogen inputs. *Agric Ecosyst Environ* 202:139–147. doi: 10.1016/j.agee.2014.12.021
- Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS, et al (2009) Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *J Bacteriol* 191:4534–4545. doi: 10.1128/jb.00504-09
- Shibata H, Matsubae K, Ma L, et al (2017) Nitrogen footprints: Regional realities and options to reduce nitrogen loss to the environment. *Ambio* 46:129–142. doi: 10.1007/s13280-016-0815-4
- Tapia-Hernández JA, Rodríguez-Félix DE, Plascencia-Jatomea M, et al (2018) Porous wheat gluten microparticles obtained by electrospray: Preparation and characterization. *Adv Polym Technol* 37:2314–2324. doi: 10.1002/adv.21907
- Vital López L, Hernández MAC, Dávila SF, Herrera AM (2015) Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. *Phyton (B Aires)* 84:233–243
- Wang S, Radny D, Huang S, et al (2017) Nitrogen loss by anaerobic ammonium oxidation in unconfined aquifer soils. *Sci Rep* 7:1–10. doi: 10.1038/srep40173
- Wang WJ, Reeves SH, Salter B, et al (2016) Effects of urea formulations, application rates and crop residue retention on N₂O emissions from sugarcane fields in Australia. *Agric Ecosyst Environ* 216:137–146. doi: 10.1016/j.agee.2015.09.035
- Zeng J, Liu X, Song L, et al (2016) Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil Biol Biochem* 92:41–49. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.09.018
- Zhou Z, Du C, Zhou J, et al (2015) Biodegradation of a biochar-modified waterborne polyacrylate membrane coating for controlled-release fertilizer and its effects on soil

bacterial community profiles. *Environ Sci Pollut Res* 22:8672–8682. doi:
10.1007/s11356-014-4040-z

Figure Captions

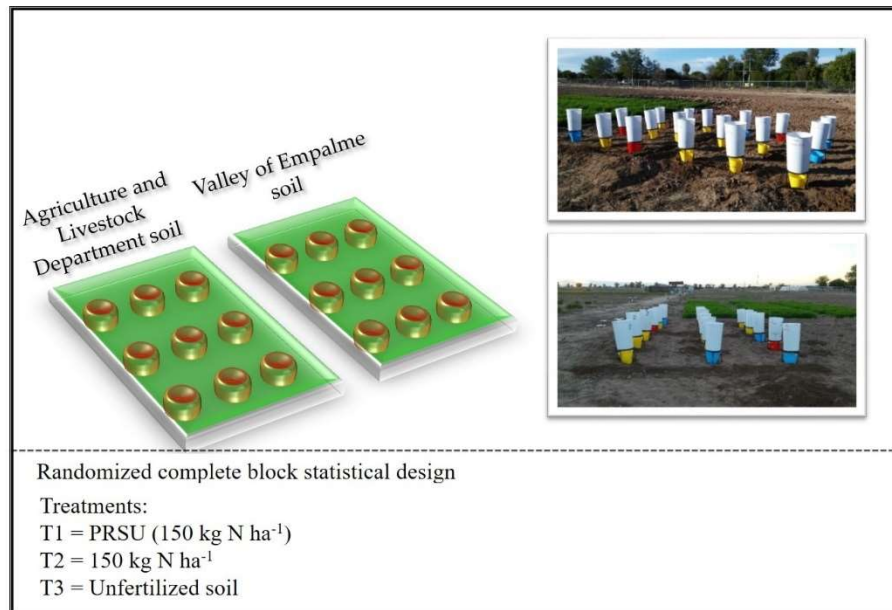


Fig. 1. Statistical design in randomized complete block with three treatments.

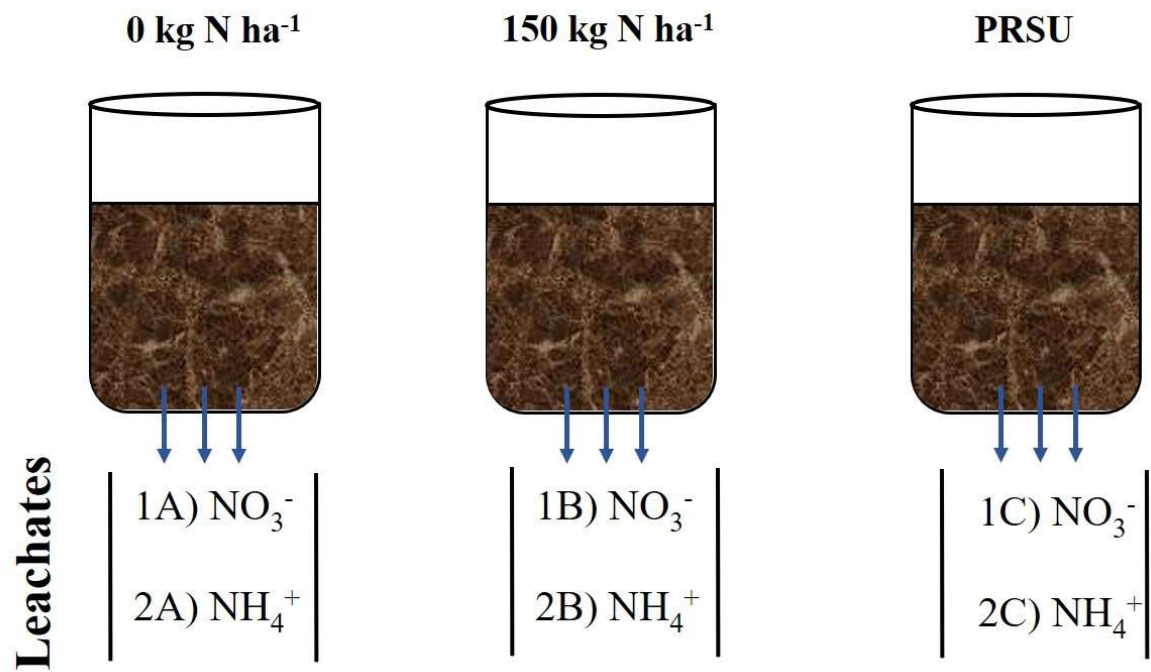


Fig. 2. Leachates of nitrates and ammonium from the three fertilization treatments.

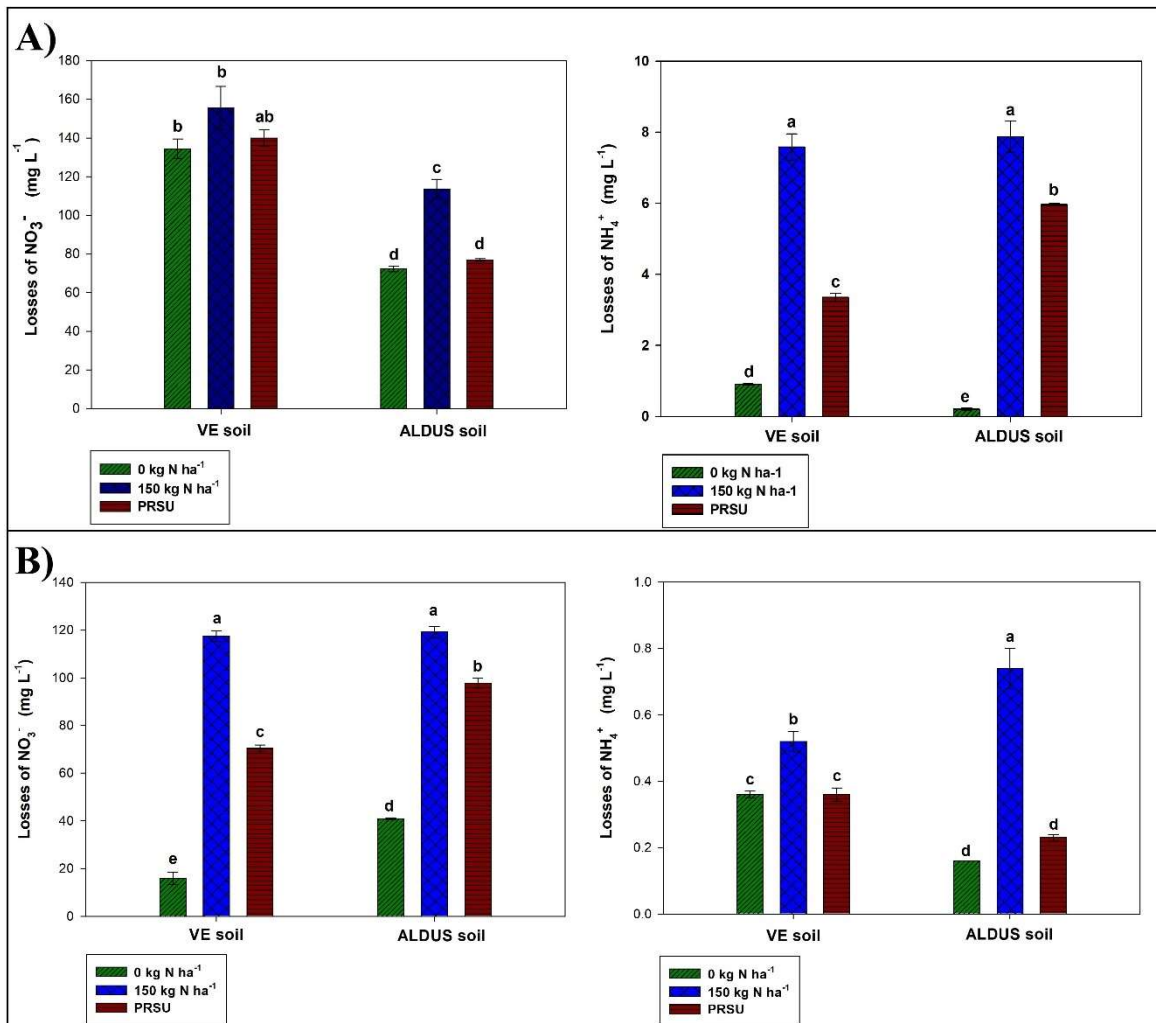


Fig. 3. Concentrations of NO_3^- and NH_4^+ in two types of soils during the first irrigation a) and the second irrigation b).

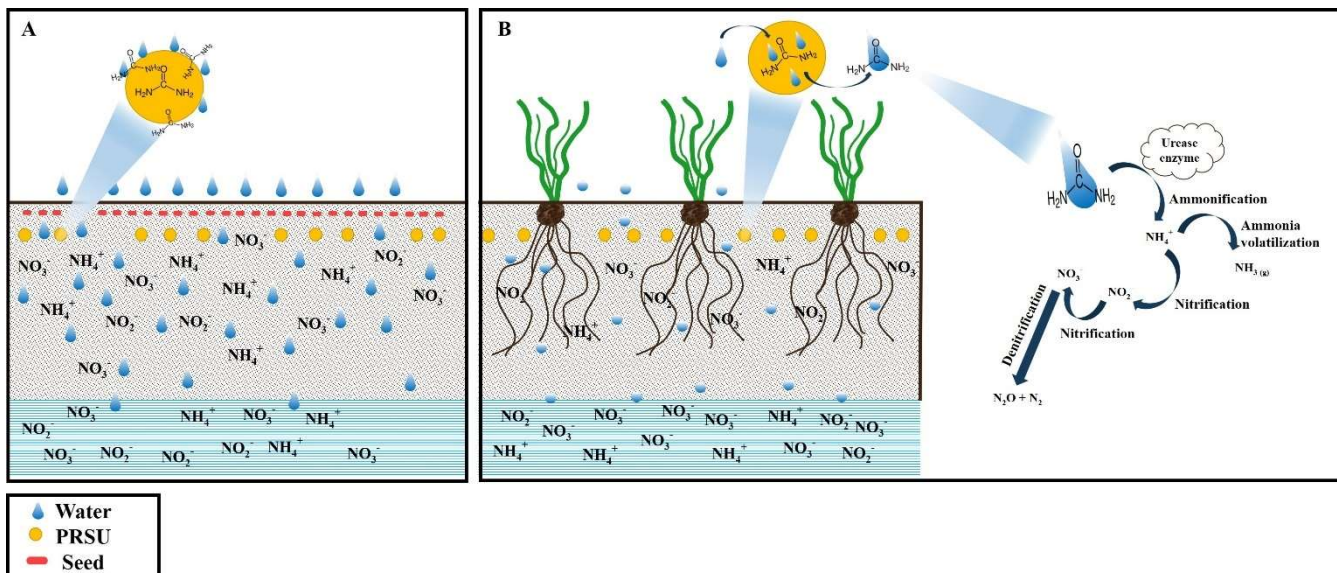


Fig. 4. Schematic description on application of the PRSU: A) first irrigation and nutrient losses, and B) second irrigation, nutrient loss and nitrogen cycle.

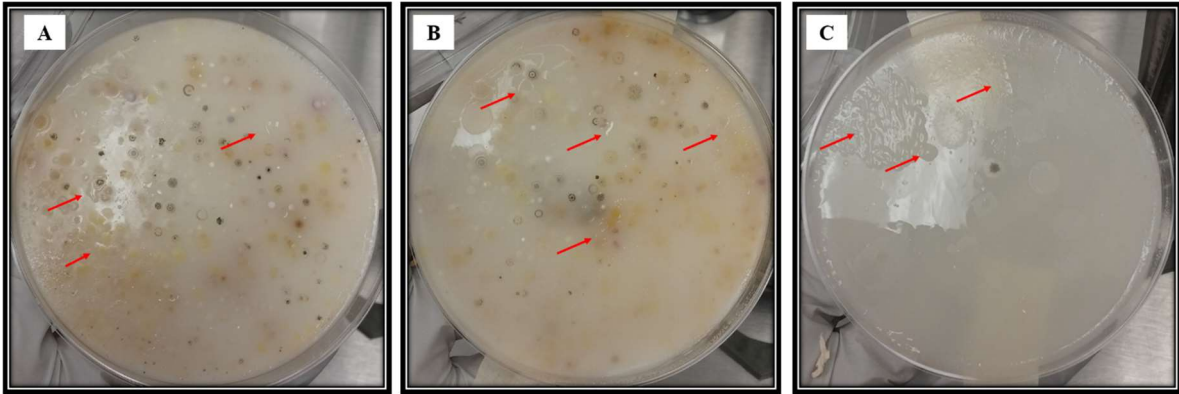


Fig. 5. Growth of the microbial communities in Ashby-Mannitol Agar: A) soil from VE, B) soil from ALDUS, and C) similar colonies from both samples. Arrows indicate the similar colonies.

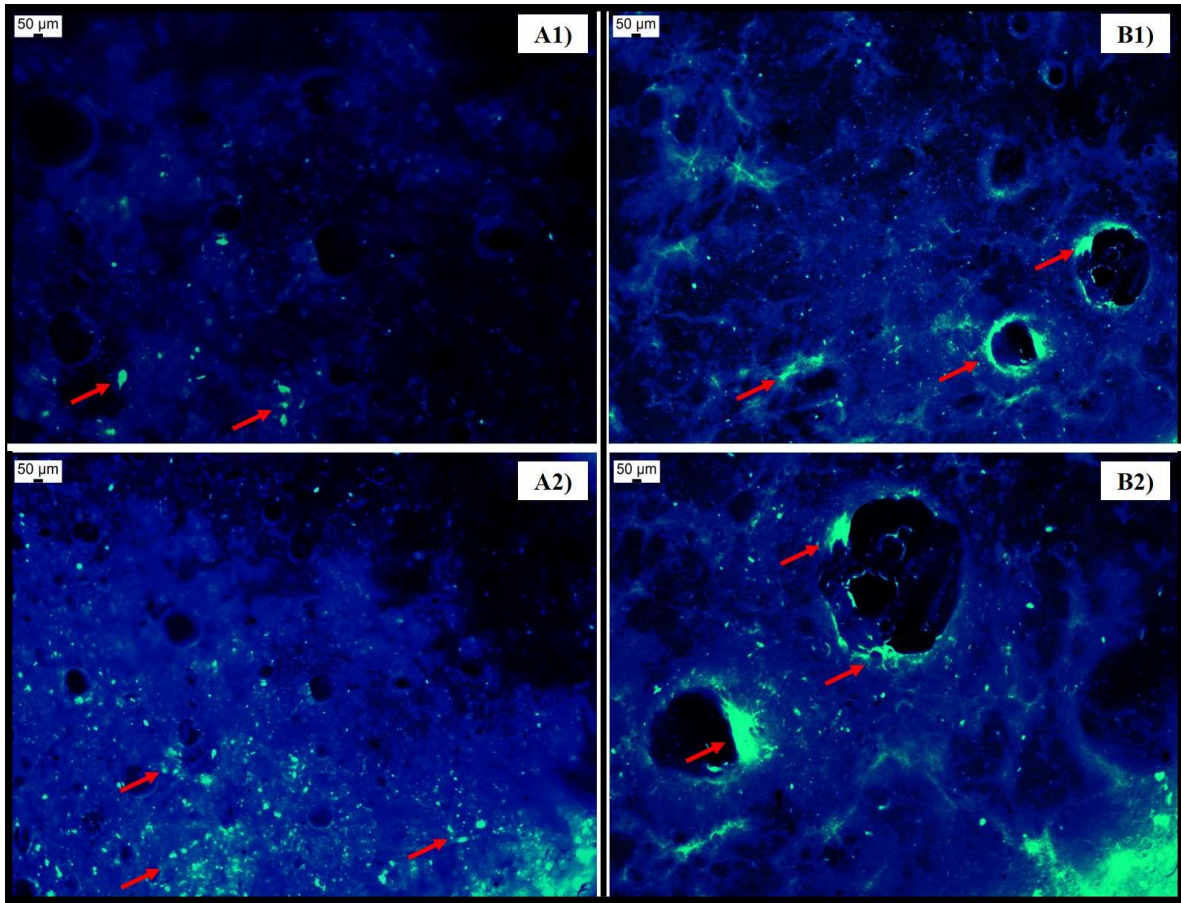


Fig. 6. Fluorescent images using a magnification of 10X with DAPI stain: A1) and A2) PRS without urea, and B1) and B2) PRSU. Arrows indicate the viable micro-organisms.

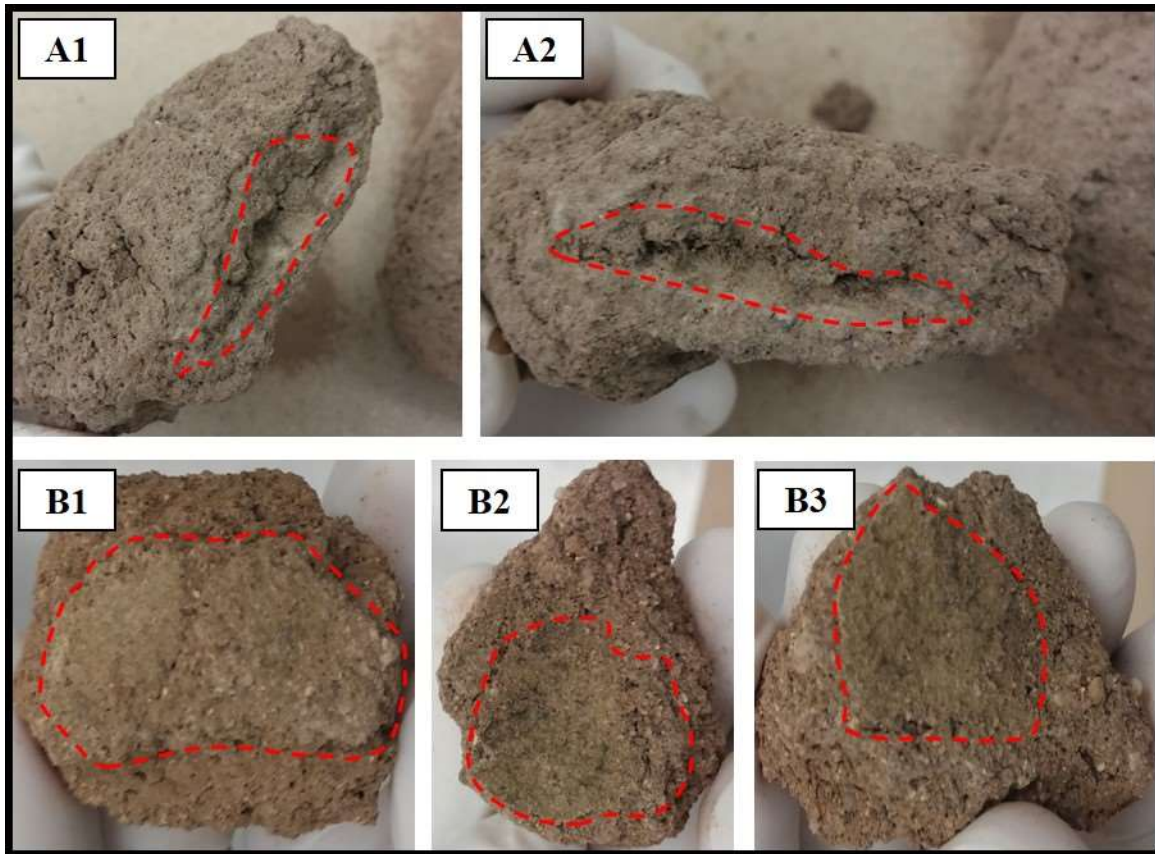


Fig. 7. PRSU images where the dotted red line indicates the zone of PRSU remaining after application in both soils; ALDUS (A1 and A2) and VE (B1, B2, and B3).

Anexo 3



INSTITUTO DE AGROBIOTECNOLOGIA
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Gobierno de Navarra-UPNA

Iker Aranjuelo Michelena
Instituto de Agrobiotecnología, IdAB .
Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC.
Av. Pamplona 123.
31192 Mutilva, Navarra
España

Como responsable del Departamento de Agricultura Sostenible y Cambio Climático del Instituto de Agrobiotecnología (IdAB-CSIC), quería

CERTIFICAR que:

El doctorando Carlos Gregorio Barreras ha trabajado en nuestro laboratorio desde el 16 de mayo al 17 de junio del 2019.

Durante su estancia, Carlos ha trabajado en el fenotipado y toma de muestras de un ensayo con diferentes tratamientos de fertilización de trigo. Con las citadas muestras Carlos ha procedido a la cuantificación del perfil de carbohidratos (azúcares solubles y almidón) mediante un equipo espectrofotométrico y el perfil de amino ácidos mediante HPLC. En este sentido quería remarcar el gran trabajo realizado por Carlos así y como su actitud muy trabajadora y contribución a crear una excelente atmósfera dentro del equipo de investigación.

Si necesitan alguna aclaración adicional sobre la actividad realizada por el Doctorando Carlos Gregorio Barreras no duden en ponerse en contacto conmigo.



Mutilva, 17 de Junio 2019