

Hidroxiapatita de calcio mejora la calidad forrajera y compuestos bioactivos de alfalfa

Calcium hydroxyapatite improves forage quality and bioactive compounds in alfalfa

Jazmín Monserrat Gaucín-Delgado¹ , Belén Guadalupe Rodríguez-García² , Jessica María Flores-Salas² , Nuria Aide López-Hernández³ , Héctor Donaciano García-Sánchez⁴ ,
Ricardo Israel Ramírez-Gottfried^{2*} 

¹Universidad Politécnica de Gómez Palacio, Carretera El Vergel-La Torreña, El Vergel, CP. 35120. Gómez Palacio, Durango, México.

²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad-Laguna: Periférico Raúl López Sánchez s/n, Col. Valle Verde, CP. 27054. Torreón, Coahuila, México.

³Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Relación Agua, Suelo, Planta, Atmósfera. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Km. 6.5 Margen Derecha Canal de Sacramento, CP. 35079. Gómez Palacio, Durango, México.

⁴Facultad de Agricultura y Zootecnia. Universidad Juárez del Estado de Durango. Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo km 35, Venecia. CP. 35110. Tlahualilo, Durango, México.

*Autor de correspondencia: gottfried_ricardo@hotmail.com

Artículo científico

Recibido: 11 de febrero de 2026

Aceptado: 10 de marzo 2026

RESUMEN. La producción sostenible de forrajes requiere estrategias innovadoras que mejoren simultáneamente la calidad nutricional y la eficiencia en el uso de recursos. En alfalfa (*Medicago sativa* L.), el fósforo (P) es un nutriente esencial que participa en la transferencia de energía, la fotosíntesis, el crecimiento radicular y la síntesis de compuestos estructurales y nitrogenados, procesos que determinan directamente el rendimiento y el valor nutritivo del forraje. Sin embargo, los fertilizantes fosfatados convencionales presentan baja eficiencia especialmente en suelos calcareos y pH alto, ya que una fracción considerable del P aplicado se inmoviliza o pierde disponibilidad, lo que limita su aprovechamiento por las plantas y reduce la sostenibilidad de los sistemas productivos. En este contexto, la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) representa una alternativa atractiva como fuente de fósforo, debido a su naturaleza de fosfato cálcico de liberación gradual y a su capacidad de suministrar simultáneamente calcio. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación foliar de nanopartículas de hidroxiapatita de calcio (nHAP) sobre el rendimiento, la calidad nutricional (bromatológica) y el perfil de compuestos bioactivos en alfalfa, bajo un diseño completamente al azar con seis concentraciones (0, 100, 200, 300, 400 y 500 mg L⁻¹) y cinco repeticiones. La dosis de 100 mg L⁻¹ incrementó la materia seca y la proteína cruda, y redujo las fracciones fibrosas, lo que refleja una mejora en la calidad nutricional del forraje. En cambio, las dosis de 300 mg L⁻¹ mejoraron el contenido de clorofilas, lo que sugiere una mayor eficiencia fotosintética. Las dosis altas (400-500 mg L⁻¹) estimularon la acumulación de sólidos solubles totales, flavonoides, la capacidad antioxidante y la actividad de enzimas antioxidantes. Estos resultados evidencian que las nHAP funcionan como una herramienta biotecnológica para mejorar los atributos nutricionales y funcionales de la alfalfa en sistemas de producción sostenibles.

Palabras clave: *Medicago sativa* L., nanofertilizante, dosis-respuesta, calidad de forraje, antioxidantes, fibra detergente.

ABSTRACT. Sustainable forage production requires innovative strategies that simultaneously improve nutritional quality and resource use efficiency. In alfalfa (*Medicago sativa* L.), phosphorus (P) is an essential nutrient involved in energy transfer, photosynthesis, root growth, and the synthesis of structural and nitrogenous compounds, processes that directly determine forage yield and nutritive value. However, conventional phosphate fertilizers exhibit low efficiency, especially in calcareous soils with high pH, as a considerable fraction of the applied P becomes immobilized or loses availability. This limits plant uptake and reduces the sustainability of production systems. In this context, hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) represents an attractive alternative as a phosphorus source, due to its gradual-release calcium phosphate nature and its ability to simultaneously supply calcium. The objective of this study was to evaluate the effect of foliar application of calcium hydroxyapatite nanoparticles (nHAP) on yield, nutritional (bromatological) quality and bioactive compound profile in alfalfa, using a completely randomized design with six concentrations (0, 100, 200, 300, 400, and 500 mg L⁻¹) and five replications. The dose of 100 mg L⁻¹ increased dry matter and crude protein, and reduced fibrous fractions, reflecting an improvement in forage nutritional quality. In contrast, doses of 300 mg L⁻¹ enhanced chlorophyll content, suggesting greater photosynthetic efficiency. High doses (400–500 mg L⁻¹) stimulated the accumulation of total soluble solids, flavonoids, antioxidant capacity, and antioxidant enzyme activity. These results demonstrate that nHAP functions as a biotechnological tool to improve the nutritional and functional attributes of alfalfa in sustainable production systems.

Keywords: *Medicago sativa* L., nanofertilizer, dose-response, forage quality, antioxidants, detergent fiber.

Como citar: Gaucín-Delgado JM, Rodríguez-García BG, Flores-Salas JM, López-Hernández NA, García-Sánchez HD, Ramírez-Gottfried RI (2026) Hidroxiapatita de calcio mejora la calidad forrajera y compuestos bioactivos de alfalfa. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 13(2): e5073. DOI: 10.19136/era.a13n2.5073.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la agricultura se ve presionada por la necesidad de aumentar la producción alimentaria, al tiempo que debe reducir el impacto negativo de los fertilizantes sintéticos, lo que representa un reto complejo (Kopittke *et al.* 2019, Lezoche *et al.* 2020). En el marco de esta problemática global, la producción sustentable de forrajes para la alimentación pecuaria constituye un área de especial atención, tanto por su importancia como por su elevada sensibilidad a factores limitantes. En este contexto, los forrajes constituyen la base de la nutrición del ganado, determinando directamente la producción de bienes de origen animal, como carne y leche. Su papel es fundamental en los sistemas agroalimentarios, contribuyendo significativamente tanto a la seguridad alimentaria global como a la estabilidad económica (Moorby y Fraser 2021, Peyraud y Astigarraga 2023). La alfalfa (*Medicago sativa* L.), conocida a nivel mundial como la "reina de las forrajeras", destaca por su elevado aporte de proteína cruda, fibra de buena digestibilidad y su capacidad para suministrar minerales esenciales (Feng *et al.* 2022, Droushiotis 2023).

En el contexto mexicano, este cultivo ocupa el primer lugar entre los forrajes en términos de superficie sembrada, al concentrar más de la mitad (57%) del área total destinada a la producción de forrajes, por encima de especies como maíz, avena y sorgo (Quiñones-Muñoz *et al.* 2022, SIAP 2023). No obstante, su establecimiento y manejo enfrentan limitantes importantes, entre las que sobresalen la disponibilidad limitada de agua y la baja concentración nativa de fósforo (P) en los suelos, factores que restringen su rendimiento potencial (Tan y Yolcu 2021, Lynch 2019). Las proyecciones de cambio climático para las próximas décadas no son alentadoras, ya que se estima una contracción de hasta el 24.7% en las zonas de alto potencial productivo para alfalfa en México hacia el año 2070, lo que resalta la necesidad apremiante de implementar sistemas de producción más resilientes (Rojas-Downing *et al.* 2017, Ahmed *et al.* 2024).

En este escenario, la nanotecnología aplicada a la agricultura ha cobrado relevancia como una alternativa prometedora para aumentar la productividad, elevar la calidad de los cultivos y optimizar el aprovechamiento de los nutrientes (Kah *et al.* 2019, Yadav *et al.* 2023). En este sentido, las nanopartículas de hidroxiapatita (nHAp) han cobrado gran relevancia por su capacidad para suministrar fósforo y calcio. A diferencia de los fertilizantes fosfatados convencionales, que son propensos a la fijación rápida y la inmovilización en el suelo, especialmente en suelos calcareos y pH alto, las nHAp presentan una liberación gradual de nutrientes, lo que causa una mayor biodisponibilidad y menores pérdidas (Elsayed *et al.* 2022, Montalvo *et al.* 2020). Su baja toxicidad reportada y alta biocompatibilidad las posicionan además como un componente viable para la intensificación agrícola sostenible (Tiwari *et al.* 2022, Shang *et al.* 2021). Si bien los efectos positivos de las nHAp en la nutrición y el crecimiento de algunos cultivos han sido documentados, existe una brecha de conocimiento respecto a su aplicación foliar en leguminosas forrajeras perennes. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación foliar de nHAp sobre el rendimiento, la calidad bromatológica y los compuestos bioactivos del forraje de alfalfa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

La investigación se llevó a cabo en condiciones de invernadero en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, en Torreón, Coahuila, México (25°32'38" LN, 103°25'08" LO). El clima de la región es desértico y seco, con una precipitación media anual de 250 mm y alta radiación solar (Hernández-Ordáz *et al.* 2013).

Síntesis y caracterización de las nanopartículas

Las nHAp se sintetizaron mediante el método de precipitación en medio acuoso descrito por Abdelmigid *et al.* (2022). Se utilizaron como precursores nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y fosfato diamónico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$); el pH de la reacción se ajustó entre 10 y 11, mediante la adición de NH_4OH . La suspensión resultante fue sometida a un proceso de envejecimiento, lavado y secado por liofilización para preservar su estructura nanométrica. La caracterización se realizó de la siguiente manera: el tamaño hidrodinámico y el potencial zeta se midieron mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern); la morfología y composición elemental se analizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, JEOL JEM-2100) acoplada a Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS); la cristalinidad se determinó por Difracción de Rayos X (XRD, Bruker D8 Advance) y los grupos funcionales por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR, Thermo Scientific Nicolet iS5). Los parámetros clave se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de hidroxiapatita (nHAp) sintetizadas.

Parámetro	Método	Resultado
Tamaño hidrodinámico	DLS	68.5 ± 12.3 nm
Índice de polidispersión (PDI)	DLS	0.21
Potencial Zeta	DLS	-25.4 ± 3.1 mV
Morfología	TE	Nanopartículas esféricas/elongadas
Tamaño de partícula (TEM)	TEM	45 ± 18 nm (largo) $\times$ 20 ± 8 nm (ancho)
Relación Ca/P (molar)	EDS	1.67 ± 0.05
Estructura cristalina	XRD	Hidroxiapatita cristalina

Material vegetal y manejo agronómico

Se utilizó alfalfa (*Medicago sativa* L.) variedad RUVA 101® (Ruvaseed, México). La siembra fue realizada en macetas de polietileno (12 L) rellenas con una mezcla homogénea de arena de río, peat moss y perlita equivalentes a aproximadamente 33.3% de cada componente, con un pH 6.8 y CE 0.8 dS m^{-1} . La densidad de siembra se ajustó a 35 kg ha^{-1} , la cual fue directa. La fertilización se realizó mediante una solución Steiner (Steiner 1961) y el riego se efectuó a capacidad de campo, manteniendo la humedad adecuada en el sustrato. Para el manejo fitosanitario aplicó Imidacloprid® (350 SC, 5 mL L^{-1}), de manera preventiva contra *Aphis craccivora*. Para realizar los análisis correspondientes se tomaron muestras de cultivos en el inicio de floración (10% de floración).

Diseño experimental y tratamientos

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con seis dosis crecientes de nHAp aplicadas vía foliar: 0 (control), 100, 200, 300, 400 y 500 mg L⁻¹, cada tratamiento con cinco repeticiones. Las soluciones asperjadas fueron preparadas a partir de una solución madre de 10.06 g L⁻¹ mediante diluciones. Se realizaron seis aplicaciones foliares con un intervalo de 15 días, utilizando un volumen de 500 mL por tratamiento para asegurar el punto de goteo y una cobertura homogénea del dosel.

Parámetros Bromatológicos

La materia seca (MS): Se determinó por el método gravimétrico tras deshidratación en estufa de aire forzado a 70° C hasta peso constante (Felisa®, España). Nitrógeno total (NT) y proteína cruda (PC): La determinación se llevó a cabo mediante el método micro-Kjeldahl, utilizando el equipo KJELTEC™ 8100 (Foss®) siguiendo el protocolo estándar (Lynch y Barbano 1999). El porcentaje de nitrógeno y de proteína cruda se obtuvo utilizando el factor de conversión de 6.25. Fibra detergente ácida (FDA) y Fibra detergente neutra (FDN): Las fibras se determinaron mediante el método de Van Soest (1967) empleando un digestor de fibra (Ankom Technology). Se utilizó 0.5 g de muestra molida (1 mm) se colocaron en bolsas de filtro y se sometieron a digestión con solución detergente ácida para (FDA) o neutra para (FDN). Posteriormente, las bolsas se lavaron con agua caliente y acetona, se secaron a 105 °C durante 12 h y se pesaron para calcular el porcentaje de fibra.

Pigmentos fotosintéticos y sólidos solubles

La cuantificación de pigmentos fotosintéticos se realizó siguiendo el protocolo de Nagata y Yamashita (1992). Para ello, 0.1 g de tejido vegetal fresco se homogeneizó en 10 mL de acetona al 80%. "El extracto se centrifugó y la absorbancia del sobrenadante se midió a 663 y 645 nm. Las concentraciones de clorofila a, b y total se calcularon con las ecuaciones estándar y se expresaron en mg 100 g⁻¹ de peso fresco. El contenido de sólidos solubles totales (SST): Se determinó macerando 5 g de tejido fresco con 5 mL de agua destilada. El líquido obtenido por centrifugación (3 000 rpm, 5 min) se utilizó para medir los °Brix directamente con un refractómetro manual (Master 2311, Atago®, Tokyo, Japón) con un rango de 0 a 32%.

Compuestos Bioactivos

Para determinar los extractos para compuestos bioactivos se mezclaron 2 g de muestra fresca con 10 mL de etanol al 80% en tubos de ensayo. Los tubos se colocaron en un agitador orbital (OS-3000 Shaker) en oscuridad durante 24 h a 200 rpm y a temperatura ambiente (Ahmad-Qasem *et al.* 2013). Posteriormente, se centrifugaron a 3 000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se utilizó para su posterior análisis. El contenido fenólico total: Se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Gaucin *et al.* 2021). Se tomaron 50 µL de extracto etanólico y se mezclaron con 3 mL de agua destilada, 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) y, después de 3 min, con 750 µL de Na₂CO₃ (20%). Tras 2 h de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso fresco (mg EAG 100 g⁻¹ PF). Los flavonoides totales: Se determinaron por el método colorimétrico (Sariñana-Navarrete *et al.* 2023). A 250 µL de extracto se añadieron 1.25 mL de agua destilada y 75 µL de NaNO₂ (5%). Tras 5 min, se agregaron 150 µL de AlCl₃ (10%), y después de 6

min, 500 μL de NaOH (1 M) y 275 μL de agua. Se midió la absorbancia a 510 nm. La determinación de flavonoides se realizó mediante una curva patrón con quercetina ($r^2 = 0.998$), reportando los resultados en mg equivalentes de quercetina por 100 g de peso fresco (mg EQ 100 g^{-1} PF). La capacidad antioxidante total se midió conforme a Brand-Williams *et al.* (1995), mezclando 50 μL del extracto con 1,950 μL de DPPH• en etanol (0.025 mg mL^{-1}). Tras 30 min en oscuridad, se midió la absorbancia a 517 nm. La capacidad antioxidante se expresó en μM equivalentes de Trolox por 100 g de peso fresco (μM ET 100 g^{-1} PF).

Actividad Enzimática

La actividad de glutatión peroxidasa (GPX; EC 1.11.1.9) se determinó según el método de Eshdat *et al.* (1997). Brevemente, se monitoreó la oxidación de NADPH a 340 nm en un sistema de reacción que contenía buffer fosfato (50 mM, pH 7.0), glutatión reducido (GSH, 1 mM), H_2O_2 (0.6 mM) y extracto enzimático. La actividad se expresó como nmol de GSH oxidado por minuto por mg de proteína (nmol GSH min^{-1} mg^{-1} prot). Mientras que la actividad de catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se cuantificó según Anjum *et al.* (2016) mediante la descomposición de H_2O_2 a 240 nm. La mezcla de reacción contenía buffer fosfato (50 mM, pH 7.0) y 15 mM H_2O_2 . La actividad se expresó como μmol de H_2O_2 descompuesto por minuto por mg de proteína (μmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1} prot). Para ambos ensayos, el contenido de proteína en los extractos se determinó mediante el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Análisis de correlación y viabilidad económica

El estudio económico se estructuró en tres niveles: evaluación experimental, proyección comercial y análisis de sensibilidad. En el primero, se calcularon los índices beneficio-coste (B/C) y retorno de inversión (ROI) con base en el incremento observado de materia seca (28,238 kg MS ha^{-1} año^{-1}) y el precio regional de la alfalfa (\$3.20 MXN kg^{-1}), contrastando estos beneficios con los costos del tratamiento con nHAp elaborado a escala de laboratorio. En la segunda fase, se proyectó un escenario de adopción tecnológica a nivel comercial que incorporó: (a) una rebaja del 60% en el costo de las nanopartículas por efectos de escala industrial; (b) un aumento del 22.41% en el rendimiento sobre el promedio regional; y (c) un margen de precios para la alfalfa de \$3.00 a \$3.50 MXN kg^{-1} . Finalmente, se realizó un ejercicio de sensibilidad unidireccional sobre las variables precio, costo y rendimiento para evaluar la solidez de los resultados ante cambios en estos factores. El análisis asumió estabilidad en los precios de mercado y no consideró beneficios adicionales, como la posible reducción del uso de fertilizantes fosfatados convencionales, que se recomiendan cuantificar en estudios posteriores a escala semicomercial.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La normalidad y homocedasticidad se verificaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias entre medias se determinaron mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y una matriz de correlación de Pearson para identificar las interrelaciones entre variables en estudio. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.0 y el software R versión 4.3.1 con el paquete FactoMineR.

RESULTADOS

Parámetros bromatológicos

La aplicación foliar de nHAp modula los parámetros nutricionales del forraje de alfalfa (Tabla 2). El contenido de MS y PC mostró los mayores valores con la dosis de 100 mg L⁻¹, registrando incrementos de 22.41 y 25.091%, con relación al testigo. Dosis superiores no mostraron efectos con relación al tratamiento testigo.

Tabla 2. Efecto de nanopartículas de hidroxiapatita de calcio (nHAp) sobre parámetros nutricionales del forraje de alfalfa.

nHAp (mg L ⁻¹)	Materia seca (%)	Proteína cruda (%)	FDA (%)	FDN (%)
Testigo	19.31 ± 0.91 ^b	22.48 ± 0.60 ^b	15.94 ± 2.06 ^a	32.60 ± 1.48 ^a
100	22.41 ± 1.05 ^a	25.09 ± 0.67 ^a	12.11 ± 1.56 ^b	27.92 ± 1.27 ^b
200	20.20 ± 0.99 ^b	22.63 ± 0.61 ^b	12.53 ± 1.62 ^{ab}	31.80 ± 1.45 ^a
300	20.95 ± 1.03 ^b	21.88 ± 0.59 ^b	13.05 ± 1.68 ^{ab}	31.58 ± 1.44 ^a
400	20.94 ± 1.03 ^b	22.84 ± 0.61 ^b	14.06 ± 1.81 ^{ab}	30.07 ± 1.37 ^{ab}
500	20.38 ± 1.00 ^b	22.45 ± 0.60 ^b	14.32 ± 1.85 ^{ab}	30.15 ± 1.37 ^{ab}

Medias (± DE) con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En términos de calidad de fibra el uso de nHAp favoreció la digestibilidad al reducir las fracciones FDA y FDN con la dosis de 100 mg L⁻¹, reduciendo la FDA en un 24.02% y la FDN en un 14.35% respecto al tratamiento control. La dosis de 200 mg L⁻¹ mostró reducciones similares en FDA, mientras que las dosis superiores presentaron valores intermedios sin diferencias estadísticas claras con el control.

Pigmentos fotosintéticos y sólidos solubles

La aplicación foliar de nanopartículas de nHAp modulo el contenido de clorofilas y sólidos solubles del forraje de alfalfa (Tabla 3). El contenido de clorofila A no presentó diferencias entre tratamientos, con valores que oscilaron entre 5.17 y 5.47 mg 100 g⁻¹ de peso fresco. En contraste, la clorofila B mostró incrementos particularmente en las dosis de 300 mg L⁻¹, las cuales registraron los valores más altos (23.08 mg 100 g⁻¹ de peso fresco, respectivamente), con un incremento del 39.7% respecto al testigo. Con relación al contenido total de clorofila total presentó una tendencia similar a la observada en clorofila B. El contenido de sólidos solubles totales (°Brix), mostraron incrementos dependientes de las dosis de nHAp, las dosis de 200 y 500 mg L⁻¹ presentaron los valores más altos con 15.52 y 15.64%, respectivamente.

Compuestos bioactivos

En cuanto a los compuestos bioactivos, la aplicación foliar de nHAp provocó respuestas selectivas en el forraje de alfalfa (Tabla 4). Mientras que los niveles de fenoles totales se mantuvieron sin cambios significativos entre los distintos tratamientos, con valores comprendidos entre 92.20 y 97.96 mg EAG 100 g⁻¹ de peso fresco. En cambio, el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante (C-AOX) sí mostraron una dependencia clara de la dosis de nHAp empleada. Las

concentraciones de 400 y 500 mg L⁻¹ alcanzaron los valores más elevados (88.50 y 88.67 mg EQ 100 g⁻¹ de peso fresco, respectivamente), superando al tratamiento testigo.

Tabla 3. Contenido de clorofilas y sólidos solubles en alfalfa tratada con diferentes concentraciones de nHAp.

nHAp mg L ⁻¹	Clorofila A (mg 100 g ⁻¹ PF)	Clorofila B (mg 100 g ⁻¹ PF)	Clorofila Total (mg 100 g ⁻¹ PF)	Sólidos Solubles Totales °Brix
Testigo	5.25 ± 0.28 ^a	15.12 ± 0.77 ^c	20.37 ± 0.80 ^c	13.81 ± 0.39 ^c
100	5.17 ± 0.27 ^a	15.17 ± 0.77 ^c	20.35 ± 0.80 ^c	14.12 ± 0.40 ^{bc}
200	5.17 ± 0.27 ^a	19.94 ± 1.01 ^b	25.12 ± 0.99 ^b	15.52 ± 0.44 ^a
300	5.37 ± 0.28 ^a	23.08 ± 1.17 ^a	28.46 ± 1.12 ^a	14.52 ± 0.41 ^{bc}
400	5.47 ± 0.29 ^a	21.60 ± 1.10 ^{ab}	27.07 ± 1.07 ^{ab}	14.93 ± 0.42 ^{ab}
500	5.47 ± 0.29 ^a	20.76 ± 1.06 ^b	26.23 ± 1.03 ^b	15.64 ± 0.44 ^a

Medias (± DE) con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de nHAp sobre el contenido de compuestos bioactivos en alfalfa.

nHAp mg L ⁻¹	Fenólicos (mg EAG 100 g ⁻¹ PF)	Flavonoides (mg EQ 100 g ⁻¹ PF)	C-AOX (μM ET 100 g ⁻¹ PF)
0 (Testigo)	92.20 ± 1.53 ^a	81.20 ± 1.68 ^b	61.95 ± 2.68 ^b
100	96.65 ± 1.61 ^a	85.02 ± 1.76 ^{ab}	65.85 ± 2.85 ^{ab}
200	97.63 ± 1.62 ^a	85.22 ± 1.76 ^{ab}	65.27 ± 2.82 ^{ab}
300	96.97 ± 1.61 ^a	85.85 ± 1.78 ^{ab}	65.15 ± 2.82 ^{ab}
400	97.55 ± 1.62 ^a	88.50 ± 1.83 ^a	68.90 ± 2.98 ^a
500	97.96 ± 1.63 ^a	88.67 ± 1.84 ^a	68.77 ± 2.97 ^a

Medias (± DE) con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). C-AOX: Capacidad antioxidante.

Actividad enzimática

La actividad de las enzimas antioxidantes en hojas de alfalfa mostró una respuesta dependiente de la concentración de nHAp aplicada (Tabla 5). La actividad de glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT), presentaron incrementos progresivos conforme aumentó la dosis de nHAp. La concentraciones de 500 mg L⁻¹ registro un incremento del 59.4% y de 58.2% con relación al testigo.

Tabla 5. Actividad de enzimas antioxidantes en hojas de alfalfa tratada con diferentes concentraciones de nHAp.

nHAp mg L ⁻¹	GPX (nmol GSH min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	CAT (μmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)
Testigo	16.37 ± 0.65 ^d	38.03 ± 0.40 ^e
100	18.47 ± 1.25 ^{cd}	41.77 ± 0.42 ^d
200	20.47 ± 0.70 ^c	47.37 ± 0.45 ^c
300	22.70 ± 0.35 ^b	50.80 ± 0.50 ^b
400	25.10 ± 0.80 ^a	59.13 ± 0.55 ^a
500	26.10 ± 0.30 ^a	60.20 ± 0.50 ^a

Medias (± DE) con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Análisis de correlación y viabilidad económica

El análisis de correlación de Pearson evidenció asociaciones significativas entre variables fisiológicas, nutricionales y bioactivas del forraje de alfalfa tratada con nHAp (Tabla 6). Se identificaron correlaciones positivas muy fuertes entre la actividad de las enzimas antioxidantes y el contenido de compuestos bioactivos. La actividad de glutatión peroxidasa (GPX) mostró una correlación positiva muy fuerte con el contenido de flavonoides ($r = 0.94$, $p < 0.001$) y con la capacidad antioxidante total (C-AOX) ($r = 0.91$, $p < 0.001$). De manera similar, la actividad de catalasa (CAT) se correlacionó positivamente con flavonoides ($r = 0.93$, $p < 0.001$) y C-AOX ($r = 0.90$, $p < 0.001$). Asimismo, el contenido de flavonoides presentó una correlación positiva muy fuerte con la capacidad antioxidante total ($r = 0.96$, $p < 0.001$). En contraste, la correlación entre fenoles totales y C-AOX fue débil y no significativa ($r = 0.45$, $p = 0.058$).

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre variables evaluadas en alfalfa tratada con nHAp.

Variable 1	Variable 2	Coeficiente (r)	Valor p	Interpretación
GPX	Flavonoides	0.94	<0.001	CP muy fuerte
GPX	C-AOX	0.91	<0.001	CP muy fuerte
CAT	Flavonoides	0.93	<0.001	CP muy fuerte
CAT	C-AOX	0.90	<0.001	CP muy fuerte
Clorofila Total	Materia Seca	0.65	0.012	CP moderada
Clorofila Total	°Brix	0.72	0.005	CP fuerte
Materia Seca	Proteína Cruda	0.88	<0.001	CP muy fuerte
Materia Seca	FDN	-0.85	<0.001	CN fuerte
Proteína Cruda	FDN	-0.82	<0.001	CN fuerte
Flavonoides	C-AOX	0.96	<0.001	CP muy fuerte
Fenólicos Totales	C-AOX	0.45	0.058	CP débil (no significativa)
GPX	Flavonoides	0.94	<0.001	CP muy fuerte

C-AOX: Capacidad antioxidante total; FDN: Fibra detergente neutra; CP: Correlación positiva; CN: Correlación negativa

En el ámbito nutricional, el contenido de clorofila total mostró una correlación positiva moderada con la materia seca ($r = 0.65$, $p = 0.012$) y una correlación positiva fuerte con los sólidos solubles (°Brix) ($r = 0.72$, $p = 0.005$). La materia seca presentó una correlación positiva muy fuerte con el contenido de proteína cruda ($r = 0.88$, $p < 0.001$) y correlaciones negativas fuertes con la fibra detergente neutra (FDN) ($r = -0.85$, $p < 0.001$). De forma consistente, la proteína cruda también se correlacionó negativamente con la FDN ($r = -0.82$, $p < 0.001$).

El análisis de rentabilidad para la dosis óptima de nHAp (100 mg L^{-1}), muestra una viabilidad económica (Tabla 7). El costo de dicho tratamiento es de \$1,080 MXN ha^{-1} , mientras que el incremento en la producción de materia seca es de $28,238 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, generando ingresos brutos de \$90,363 MXN $\text{ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$. Esto produce una la relación beneficio-costos (B/C) fue de 83.7 y un retorno de la inversión (ROI) de 8 266%, reflejando una alta rentabilidad en la producción de alfalfa.

Tabla 7. Indicadores de viabilidad económica para la aplicación de nHAp (100 mg L^{-1}) en alfalfa.

Indicador	Valor	Unidad
Costo tratamiento nHAp/ha/año	\$1 080	MXN
Producción adicional MS/ha/año	28 238	kg
Valor producción adicional	\$90 363	MXN
Relación Beneficio-Costo (B/C)	83.7	(adimensional)
Retorno de Inversión (ROI)	8 266	%

DISCUSIÓN

Parámetros bromatológicos

Las características agronómicas y bromatológicas de la alfalfa, tales como el rendimiento de MS, la PC, la FDN y la FDA, constituyen indicadores clave de la calidad del forraje y de su valor nutricional para la alimentación animal (Atumo *et al.* 2021). Los resultados del estudio demuestran que la dosis de 100 mg L^{-1} de nHAp optimizó el rendimiento y la calidad nutricional, al generar incrementos del 22.41% en la producción de MS y del 25.09% en la PC con respecto al testigo. Estos hallazgos superan el umbral del 19% de proteína cruda propuesto por Bera *et al.* (2023) para forrajes de excelente calidad. El comportamiento observado se explica por la capacidad de las nHAp para liberar fósforo y calcio de forma lenta y sostenida. Ya que el fósforo es un componente crítico en la síntesis de ATP y la activación enzimática del metabolismo del nitrógeno, lo que potencia la síntesis proteica (Ammar *et al.* 2025). En este sentido, Liu y Lal (2014) demostraron que la aplicación de nHAp en soya incrementó el rendimiento en más del 30%, asociado a una liberación sostenida de fósforo. No obstante, la respuesta positiva observada a concentraciones bajas contrasta con los efectos reportados a dosis elevadas de nanopartículas. Landa *et al.* (2024) señalaron que altas concentraciones de nanopartículas pueden inducir la expresión de genes relacionados con respuestas al estrés, defensa contra patógenos y estrés oxidativo, lo que puede traducirse en una reducción del crecimiento vegetal. De manera similar, Wu *et al.* (2024) indicaron que la elevada reactividad de algunas nanopartículas puede generar efectos adversos asociados al estrés oxidativo cuando se aplican en concentraciones excesivas. Los valores más bajos de FDN y FDA obtenidos con la dosis de 100 mg L^{-1} sugieren una mejora en la digestibilidad del material vegetal. Esta tendencia podría explicarse por el papel del calcio en forma de nanopartículas, el cual contribuye a preservar la estabilidad de las membranas celulares y a incrementar la relación entre tejidos con alta actividad metabólica y aquellos de tipo estructural (Koç e İlhan 2025). No obstante, el comportamiento no lineal observado con concentraciones superiores a 100 mg L^{-1} apunta hacia un posible fenómeno de saturación o bien a un redireccionamiento del metabolismo vegetal hacia mecanismos de defensa (Landa *et al.* 2024).

Pigmentos fotosintéticos y sólidos solubles

El aumento en los niveles de clorofila detectado en las plantas que recibieron nHAp podría estar relacionado con la liberación paulatina de fósforo, un nutriente que participa directamente en la síntesis de clorofila, así como en los mecanismos de regeneración de ATP y NADPH necesarios

para el proceso fotosintético. Las nanopartículas pueden ingresar rápidamente a los tejidos vegetales a través de los estomas y plasmodesmos, favoreciendo una mayor eficiencia y reduciendo pérdidas de fósforo (Tiwari *et al.* 2022). Resultados similares han sido reportados por Flores-Hernández *et al.* (2021) quienes demostraron que la aplicación foliar de nHAp incrementa la concentración de clorofila en *Raphanus sativus*, lo que respalda el papel de estas nanopartículas en la mejora de la eficiencia fotosintética. Esta mejora fotosintética se correlacionó fuertemente con el incremento de sólidos solubles totales, lo que puede atribuirse a un mayor transporte y acumulación de carbohidratos, favorecido por una nutrición adecuada en fósforo y calcio. Sobre lo mismo Hashem *et al.* (2023) reportaron resultados similares en melón tratado con nanopartículas, los cuales fueron asociados a una mayor eficiencia en el transporte de azúcares. No obstante, la respuesta positiva a la aplicación de nanopartículas puede verse comprometida a concentraciones elevadas. Investigaciones previas han documentado que concentraciones elevadas de nanopartículas pueden incidir desfavorablemente en la actividad fotosintética (Mustapha *et al.* 2022), disminuir los niveles de clorofila total y elevar de forma notoria los marcadores de estrés oxidativo (Malea *et al.* 2022). Por esta razón, la utilización de nHAp podría interpretarse como una estrategia de doble filo, en la que los efectos positivos están supeditados a la concentración aplicada.

Compuestos bioactivos

El aumento selectivo de flavonoides y de la capacidad antioxidante, en ausencia de cambios en los fenoles totales, apunta hacia una estimulación dirigida de la ruta de síntesis de flavonoides, en la que probablemente participa la enzima chalcona sintasa (Golkar *et al.* 2026). Este patrón de respuesta sugiere que las nHAp funcionan como agentes elicitores capaces de influir en rutas metabólicas concretas, particularmente aquellas vinculadas con la activación de mecanismos de defensa en plantas, como la vía de los fenilpropanoides, encargada de generar diversos compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes (Rivero-Montejo *et al.* 2021, Izuafa *et al.* 2025). Bajo esta perspectiva, la elevación paralela de flavonoides y de la capacidad antioxidante total registrada en este trabajo apunta a una activación sincronizada de sistemas de defensa destinados a contrarrestar las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas como consecuencia del incremento en la actividad metabólica inducida por las nHAp. Diversos estudios han demostrado que la aplicación de nanopartículas metálicas en concentraciones adecuadas puede contribuir a la reducción del estrés oxidativo en plantas, favoreciendo la eliminación de ROS producidas durante condiciones de estrés abiótico (Madanayake *et al.* 2021). Sin embargo, esta respuesta benéfica depende estrechamente de la dosis empleada. Mondéjar-López *et al.* (2024) señalaron que concentraciones elevadas de nanopartículas metálicas pueden inducir efectos fitotóxicos, debido a que estos materiales pueden generar respuestas contrastantes beneficiosas o perjudiciales según la concentración y las condiciones de exposición (Islam *et al.* 2025).

Actividad enzimática

La respuesta enzimática GPX y CAT observada corresponde a un efecto de hormesis, donde a dosis elevadas de nHAp se aumentó el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante, mientras que dosis bajas promueven el rendimiento. Diversos estudios señalan que las nanopartículas pueden actuar como elicitores de estrés moderado, promoviendo la activación de mecanismos

antioxidantes sin necesariamente generar daño fisiológico (Rivero-Montejo *et al.* 2021, Khan *et al.* 2024). En este contexto, el aumento en la actividad de GPX y CAT sugiere una mayor capacidad de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual contribuye al mantenimiento de la estabilidad metabólica bajo condiciones de mayor actividad fisiológica, manteniendo el equilibrio redox celular (Kaya *et al.* 2019), lo que permite una mayor resiliencia ante el estrés. La divergencia entre la dosis óptima para crecimiento (100 mg L^{-1}) y la dosis óptima para activación del sistema de defensa ($400\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$) subraya la versatilidad de las nHAp como herramienta de manejo, permitiendo elegir entre estrategias de biofortificación nutricional o de biofortificación funcional según el objetivo productivo.

Análisis de correlación y viabilidad económica

Mediante el análisis de correlación fue posible conocer las respuestas de tipo fisiológico, nutricional y bioactivo provocadas por la aplicación de nHAp. La relación positiva entre la actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de flavonoides, así como con la capacidad antioxidante total, refleja una acción conjunta del sistema de defensa antioxidante, donde los mecanismos de tipo enzimático y no enzimático operan de manera sincronizada frente al estímulo inducido por las nHAp. Este es consistente con lo reportado en otros estudios sobre respuestas antioxidantes generadas por nanomateriales en especies vegetales (Rivero-Montejo *et al.* 2021). Por otra parte, la correlación positiva entre el contenido de clorofila, la producción de materia seca y los sólidos solubles sugiere que el aumento en la eficiencia fotosintética se refleja en mayor acumulación de biomasa y fotoasimilados. De igual forma, la correlación negativa entre los indicadores productivos y la fibra detergente neutra respalda la noción de que las mejoras en el rendimiento y en la calidad proteica del forraje están asociadas con disminución de los componentes estructurales de la pared celular, lo cual incide favorablemente en la digestibilidad (Jia *et al.* 2018). El análisis de componentes principales reforzó esta distinción funcional, al mostrar que las concentraciones bajas de nHAp se vinculan con variables asociadas al crecimiento y la calidad nutricional, mientras que las dosis elevadas se relacionan con la estimulación del sistema antioxidante. Este patrón de comportamiento reafirma que la respuesta de la alfalfa a la aplicación de nHAp está determinada por la dosis y responde a propósitos fisiológicos diferenciados.

Desde el punto de vista económico-productivo, la aplicación de nHAp mostró potencial de rentabilidad, atribuible al incremento en la producción de materia seca y a la mejora en la calidad nutricional del forraje. Dichos efectos permiten potenciar el valor comercial de la alfalfa y fortalecer su posición competitiva en sistemas de producción intensiva. La relación costo-beneficio favorable obtenida sugiere que el uso de nHAp constituye una opción económicamente para los productores de forrajes, si se considera su incorporación en programas de manejo nutrimental más eficientes. No obstante, se requiere validación en condiciones de producción semicomercial, donde factores como la fluctuación de precios, los costos operativos y la escala de aplicación podrían incidir en su rentabilidad real.

CONCLUSIONES

La aspersión foliar de nanopartículas de hidroxiapatita de calcio (nHAp) es una alternativa eficaz para potenciar el valor agronómico de la alfalfa, aunque su efecto está fuertemente condicionado por la concentración aplicada. Se determinó que una dosis intermedia (100 mg L⁻¹) es la más apropiada para optimizar el rendimiento y la calidad bromatológica del forraje, al promover el aumento de la materia seca y la proteína cruda, y disminuir el contenido de fibra. Por el contrario, concentraciones de 400 a 500 mg L⁻¹ estimularon la producción de flavonoides y la capacidad antioxidante, lo que apunta a una activación de mecanismos de defensa que podría ser aprovechada con fines de biofortificación funcional. Estos resultados evidencian que las nHAp ofrecen la posibilidad de direccionar el metabolismo de la alfalfa hacia distintos propósitos productivos mediante un ajuste de la dosis. No obstante, se sugiere la realización de estudios a escala semicomercial y con seguimiento a largo plazo que permitan confirmar su factibilidad económica, así como evaluar la posible acumulación de nanopartículas en el tejido vegetal y sus potenciales repercusiones ambientales, previo a su implementación generalizada.

DECLARACIÓN SOBRE USO DE HERRAMIENTAS DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL GENERATIVA

En la investigación y/o preparación de este manuscrito, los autores utilizaron herramientas de inteligencia artificial generativa Grammarly con el objetivo de revisar y mejorar la redacción, la gramática y el estilo del texto en español e inglés, así como para ayudar en la búsqueda y organización de referencias bibliográficas. La revisión, verificación, edición e interpretación de todo el contenido aportado por las herramientas de IA fue realizada por los autores, quienes asumen la total responsabilidad por la integridad científica y el contenido final publicado. No se utilizó IA para el análisis de datos, la generación de resultados o la interpretación científica de los mismos.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

LITERATURA CITADA

- Abdelmigid HM, Morsi MM, Hussien NA, Alyamani AA, Alhuthal NA, Albukhaty S (2022) Green synthesis of phosphorous-containing hydroxyapatite nanoparticles (nHAP) as a novel nano-fertilizer: preliminary assessment on pomegranate (*Punica granatum* L.). *Nanomaterials* 12: 1527. <https://doi.org/10.3390/nano12091527>
- Ahmad-Qasem MH, Barraón-Catalán E, Micol V, Mulet A, García-Pérez JV (2013) Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International* 50: 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.028>

- Ahmed M, Ahmad S, Abbas G, Hussain S, Hoogenboom G (2024) Alfalfa system. In: Cropping Systems Modeling Under Changing Climate. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-0331-9_13
- Ammar M, Ashraf S, Baltrusaitis J (2025) Hydroxyapatite/urea hybrid materials: what is the basis for the enhanced nutrient efficiency? Environmental Science: Advances 4: 77-89. <https://doi.org/10.1039/D4VA00197D>
- Anjum NA, Sharma P, Gill SS, Hasanuzzaman M, Khan EA, Kachhap K (2016) Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. Environmental Science and Pollution Research 23: 19002-19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
- Atumo TT, Kauffman R, Gemiyo Talore D, Abera M, Tesfaye T, Tunkala BZ (2021) Adaptability, forage yield and nutritional quality of alfalfa (*Medicago sativa*) genotypes. Sustainable Environment 7: 1895475. <https://doi.org/10.1080/27658511.2021.1895475>
- Bera I, O'Sullivan M, Flynn D, Shields DC (2023) Relationship between protein digestibility and the proteolysis of legume proteins during seed germination. Molecules 28: 3204. <https://doi.org/10.3390/molecules28073204>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology 28: 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Droushiotis D (2023) Forage legumes: Quality, utilization and prospects. Agronomy 13(2): 315. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020315>
- Elsayed AA, Ahmed EG, Taha ZK, Farag HM, Hussein MS, AbouAitah K (2022) Hydroxyapatite nanoparticles as novel nano-fertilizer for production of rosemary plants. Scientia Horticulturae 295: 110851. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110851>
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G (1997) Plant glutathione peroxidases. Physiologia Plantarum 100: 234-240. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04779.x>
- Feng Y, Shi Y, Zhao M, Shen H, Xu L, Luo Y (2022) Yield and quality properties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and their influencing factors in China. European Journal of Agronomy 141: 126637. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126637>
- Flores-Hernández EA, Lira-Saldívar RH, Ruiz-Torres NA, García-López JL, Moreno-Reséndez A, Rodríguez-Dimas N (2021) Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita y su efecto en plántulas de *Raphanus sativus*. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 8: e2747. <https://doi.org/10.19136/era.a8n1.2747>
- Gaucín-Delgado JM, Preciado-Rangel P, González-Salas U, Sifuentes-Ibarra E, Núñez-Ramírez F, Vidal JAO (2021) La biofortificación con selenio mejora los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante en chile jalapeño. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 12: 1339-1349. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i8.3066>
- Golkar P, Vázquez-Núñez E, Peralta-Videa JR (2026) Nano-elicitation approaches to enhance secondary metabolites in medicinal plant cell cultures. Plants 15: 46. <https://doi.org/10.3390/plants15010046>
- Hashem AH, El-Sayyad GS, Al-Askar AA, Marey SA, AbdElgawad H, Abd-Elsalam KA, Saied E (2023) Watermelon rind mediated biosynthesis of bimetallic selenium-silver nanoparticles: characterization, antimicrobial and anticancer activities. Plants 12: 3288. <https://doi.org/10.3390/plants12183288>
- Islam S (2025) Toxicity and transport of nanoparticles in agriculture: effects of size, coating, and aging. Frontiers in Nanotechnology 7: 1622228. <https://doi.org/10.3389/fnano.2025.1622228>

- Izuafa A, Chimbekujwo KI, Raji RO, Oyewole OA, Oyewale RO, Abioye OP (2025) Application of nanoparticles for targeted management of pests, pathogens and disease of plants. *Plant Nano Biology* 100177. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2025.100177>
- Jia C, Zhao F, Wang X, Han J, Zhao H, Liu G, Wang Z (2018) Genomic prediction for 25 agronomic and quality traits in alfalfa (*Medicago sativa*). *Frontiers in Plant Science* 9: 1220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01220>
- Kah M, Kookana RS, Gogos A, Bucheli TD (2019) A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology* 14(6): 517-522. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0431-1>
- Kaya C, Akram NA, Sürücü A, Ashraf M (2019) Alleviating effect of nitric oxide on oxidative stress and antioxidant defence system in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants exposed to cadmium and lead toxicity applied separately or in combination. *Scientia Horticulturae* 255: 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.05.029>
- Koç ÜG, İlhan D (2025) CaO nanoparticles improve salt stress tolerance in diploid and tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) by modulating miRNA expression and physiological responses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 160: 75. <https://doi.org/10.1007/s11240-025-02969-9>
- Kopittke PM, Menzies NW, Wang P, McKenna BA, Lombi E (2019) Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International* 132: 105078. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105078>
- Landa P, Müller K, Přerostová S, Petrová Š, Mořková K, Vaněk T, Soudek P (2024) Effect of nano-hydroxyapatite and phosphate on thorium toxicity—*Arabidopsis* transcriptomic study. *Environmental and Experimental Botany* 217: 105573. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105573>
- Lezoche M, Hernandez JE, Díaz MDM, Panetto H, Kacprzyk J (2020) Agri-food 4.0: A survey of the supply chains and technologies for the future agriculture. *Computers in Industry* 117: 103187. <https://doi.org/10.1016/j.compind.2020.103187>
- Liu R, Lal R (2014) Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Scientific Reports* 4: 5686. <https://doi.org/10.1038/srep05686>
- Lynch JM, Barbano DM (1999) Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *Journal of AOAC International* 82: 1389-1398. <https://doi.org/10.1093/jaoac/82.6.1389>
- Lynch JP (2019) Root phenotypes for improved nutrient capture: An underexploited opportunity for global agriculture. *New Phytologist* 223(2): 548-564. <https://doi.org/10.1111/nph.15738>
- Madanayake NH, Adassooriya NM, Salim N (2021) The effect of hydroxyapatite nanoparticles on *Raphanus sativus* with respect to seedling growth and two plant metabolites. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 15: 100404. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100404>
- Malea P, Emmanouilidis A, Kevrekidis DP, Moustakas M (2022) Copper uptake kinetics and toxicological effects of ionic Cu and CuO nanoparticles on the seaweed *Ulva rigida*. *Environmental Science and Pollution Research* 29: 57523-57542. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19571-7>
- Mondéjar-López M, García-Simarro MP, Navarro-Simarro P, Gómez-Gómez L, Ahrazem O, Niza E (2024) Una revisión sobre la encapsulación de compuestos ecológicos en nanopartículas poliméricas naturales como nanoagroquímicos de nueva generación para la agricultura y la gestión sostenible de cultivos. *International Journal of Biological Macromolecules* 180: 136030. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136030>
- Montalvo D, Degryse F, McLaughlin MJ (2020) Natural and novel nano-fertilizers for sustainable agriculture. In: Fernández MG, Sánchez LR (eds) *Nano-enabled sustainable and precision agriculture*. Academic Press. pp. 179-200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817995-5.00008-5>
- Moorby JM, Fraser MD (2021) New feeds and new feeding systems in intensive and semi-intensive forage-fed ruminant livestock systems. *Animal* 15: 100297. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100297>

- Mustapha T, Misni N, Ithnin NR, Daskum AM, Unyah NZ (2022) A review on plants and microorganisms mediated synthesis of silver nanoparticles, role of plants metabolites and applications. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19: 674. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020674>
- Nagata M, Yamashita I (1992) Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39: 925-928. <https://doi.org/10.3136/nskkk1962.39.925>
- Peyraud JL, Astigarraga L (2023) Review of the effect of dairy farming practices on milk and beef quality. *Animal* 17: 100781. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100781>
- Quiñones-Muñoz TA, Villanueva-Rodríguez SJ, Torruco-Uco JG (2022) Nutraceutical properties of *Medicago sativa* L., *Agave* spp., *Zea mays* L. and *Avena sativa* L.: A review of metabolites and mechanisms. *Metabolites* 12: 806. <https://doi.org/10.3390/metabo12090806>
- Rivero-Montejo SDJ, Vargas-Hernandez M, Torres-Pacheco I (2021) Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants. *Agriculture* 11: 134. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020134>
- Rojas-Downing MM, Nejadhashemi AP, Harrigan T, Woznicki SA (2017) Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. *Climate Risk Management* 16: 145-163. <https://doi.org/10.1016/j.crm.2017.02.001>
- Sariñana-Navarrete MDLA, Morelos-Moreno Á, Sánchez E, Cadenas-Pliego G, Benavides-Mendoza A, Preciado-Rangel P (2023) Selenium nanoparticles improve quality, bioactive compounds and enzymatic activity in jalapeño pepper fruits. *Agronomy* 13: 652. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030652>
- SIAP (2023) Anuario estadístico de la producción agrícola. Gobierno de México. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/siap>. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2025.
- Shang Y, Hasan MK, Ahammed GJ, Li M, Yin H, Zhou J (2021) Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: A review. *Molecules* 26(7): 1797. <https://doi.org/10.3390/molecules26071797>
- Steiner AA (1961) A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil* 15: 134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Tan M, Yolcu H (2021) Current status of forage crops cultivation and strategies for the future in Turkey: A review. *Journal of Agricultural Sciences* 27: 114-121. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.903732>
- Tiwari K, Kumar Y, Singh T, Nayak R (2022) Nano technology based P fertilizers for higher efficiency and agriculture sustainability. *Annals of Plant and Soil Research* 24: 198-207. <https://doi.org/10.47815/apsr.2022.10149>
- Van Soest PJ, Wine RH (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 50: 50-55. <https://doi.org/10.1093/jaoac/50.1.50>
- Wu H, Tong J, Jiang X, Wang J, Zhang H, Luo Y (2024) More effective than direct contact: Nano hydroxyapatite pre-treatment regulates the growth and Cd uptake of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Journal of Hazardous Materials* 463: 132889. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132889>
- Yadav A, Yadav K, Ahmad R, Abd-Elsalam KA (2023) Emerging frontiers in nanotechnology for precision agriculture: Advancements, hurdles and prospects. *Agrochemicals* 2: 220-256. <https://doi.org/10.3390/agrochemicals2020016>