

Desarrollo y evaluación de un nuevo fertilizante nitrogenado de liberación lenta: complejo de inclusión de urea con ácido esteárico

Lucia, Alejandro^{1,2,4,5}; Bárcena, Alejandra^{3,4}; Costa, Lorenza^{1,3,4}; Graciano, Corina^{1,3,4}

¹Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata

²Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES, CONICET-UNLu), Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires (Argentina)

³ Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE)(CONICET- UNLP), Diag 113 y 61- (1900) La Plata, Buenos Aires (Argentina)

⁴ CONICET

⁵ luciaalejandro@yahoo.com.ar

Resumen. *La fertilización nitrogenada a gran escala y con productos o dosis inadecuados produce contaminación del suelo y napas, como así también la eutrofización de cuerpos de agua y la contaminación del aire, llevando a la formación de lluvias ácidas. En sitios marginales para la producción agropecuaria y forestal, los ambientes son más frágiles y el riesgo de contaminación es mayor que en aquellos con mejor aptitud productiva. La utilización de fertilizantes nitrogenados de liberación lenta pueden contribuir a aportar a los cultivos la dosis de nitrógeno necesaria para no disminuir la fertilidad de los suelos, y en consecuencia, disminuir la lixiviación de formas inorgánicas de nitrógeno y la contaminación ambiental asociada.*

Realizamos la síntesis y descripción de los complejos de inclusión de urea con ácido esteárico (CIU). El objetivo fue corroborar que los microorganismos del suelo o las enzimas ureasas libres, son capaces de producir la ureólisis, es decir, la liberación del amonio de la urea cuando ésta se encuentra formando parte del CIU. Evaluamos que los cristales de CIU, que presentan muy baja solubilidad en agua, pueden ser fuente de nutrientes para las plantas, es decir, que en contacto con el suelo, liberan amonio y nitrato que son las formas minerales en que las plantas pueden absorber el nitrógeno. Además, la estructura tridimensional de los cristales de CIU pueden ser utilizados para incorporar otros nutrientes o moléculas orgánicas en su estructura, como hormonas, funguicidas o insecticidas, las que serían liberadas paulatinamente, a medida que las ureasas del suelo producen la ruptura de la urea y de los cristales de CIU.

Palabras clave: Lixiviación; volatilización; nitrato; amonio; eutrofización; fertilización

Recibido: 23/06/2020 Aceptado: 06/08/2020

DOI: <https://doi.org/10.24215/26838559e012>

Evaluation of new slow-release nitrogen fertilizer: inclusion complex of urea with stearic acid

Abstract. *Fertilization with sources of nitrogen if it is done with inadequate fertilizers or doses, produce environmental problems like soil and water table contamination, eutrophication of water bodies and air contamination, leading to acid rain. In marginal sites for agriculture and forestry, environments are fragile and the risk of contamination is higher than in places with better site quality. The use of slow-release nitrogen fertilizers can contribute to give enough nitrogen to crops, in part by maintaining the soil's fertility, and thus minimizing the risk of lixiviation of inorganic nitrogen forms and the associated environmental contamination.*

We did the synthesis and description of the inclusion complexes of urea with stearic acid (CIU). The aim was to corroborate that the soil microorganisms or the free ureases enzymes are able to produce the ureolysis, which is to liberate ammonium from the urea when it is part of the CIU. We tested that the CIU crystals, which has very low water solubility can be a source of nutrients for the plants because in contact with soil ammonium and nitrate is realized. The latter are the inorganic forms that can be taken up by plants. Moreover, the tridimensional structure of the CIU make it proper to add inside the crystals other nutrients and organic molecules like hormones, fungicides and insecticides that would be realized to the soil slowly, as ureases break urea and CIU crystals.

Key words: Lixiviation; volatilization; nitrate; ammonium; eutrophication; fertilization

Novedad u originalidad local en el conocimiento (máximo 250 palabras):

La utilización de urea como fertilizante nitrogenado produce pérdidas importantes por volatilización y lixiviado, por eso los fertilizantes de liberación lenta son útiles

como herramientas para disminuir las pérdidas de nitrógeno (N). La urea en presencia de ácidos grasos forma un complejo de inclusión cristalino (CIU), cambiando su conformación tetragonal a hexagonal y disminuyendo drásticamente su solubilidad en agua. En el año 1969, Paulson y Kurtz desarrollaron varios complejos cristalinos de inclusión entre la molécula de urea y diversos ácidos grasos y determinaron que el complejo urea-ácido esteárico fue el más estable, y su hidrólisis en una arcilla limosa resultó ser más lenta que la urea sin formular. En este desarrollo evaluamos si el CIU en contacto con el suelo forestal seco y húmedo de la provincia de Misiones es utilizado como sustrato por microorganismos u enzimas ureolíticas presentes en el suelo (Watson et al, 2008), de manera que se liberen formas de N que pueden ser absorbidas por las plantas, como nitrato y amonio. Este proceso de liberación de formas de N que puedan ser utilizadas por las plantas es una condición necesaria para que el CIU pueda ser utilizado como fertilizante para cultivos agrícolas y forestales. Asimismo, la utilización de estos complejos no solo permite la liberación lenta de nitrógeno, sino que podría incluir en su estructura a terceras moléculas complejas no lineales con diferente bioactividad, que pueden liberarse a medida que el complejo se hidroliza, pudiendo de esta manera brindar otra función complementaria a la ya existente.

Grado de relevancia (máximo 250 palabras):

La fertilización nitrogenada es ampliamente utilizada en cultivos agrícolas, y en menor medida en cultivos forestales. Argentina consume 1,5 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados por año para la producción agrícola y forestal, según un [reporte](#) del Ministerio de Agroindustria para la campaña 2016-2017. La utilización frecuente de fuentes de elevada solubilidad, como la urea, junto con la selección inadecuada de la dosis y momento de fertilización, lleva a que un porcentaje elevado del fertilizante aplicado se volatilice o se lixivie, produciendo la

contaminación del aire, suelos, napas y cuerpos de agua. Las pérdidas por volatilización de amonio pueden llegar a 19 kg/ha en los 9 primeros días posteriores a la fertilización de maíz con 60 kg/ha en forma de urea (Ferraris et al. 2009). Además del impacto ambiental, estas pérdidas conllevan que parte del costo utilizado en aplicar el fertilizante, no es aprovechado por el cultivo. Esta problemática llevó, por ejemplo, a aplicar inhibidores de ureasa y de nitrificación junto con el fertilizante, con resultados dispares y elevado costo económico (Abalos et al. 2014). La aplicación de fertilizantes de liberación lenta puede ser una alternativa que reduzca las pérdidas de N. El avance de la frontera agrícola hacia ambientes marginales para los cultivos, aumenta la trascendencia de este tipo de fertilizantes, ya que los riesgos de volatilización y lixiviación son mayores en suelos de baja aptitud agrícola y forestal.

Grado de pertinencia (máximo 250 palabras):

La urea es el fertilizante nitrogenado más ampliamente utilizado a nivel nacional y mundial (Boccolini 2016), en parte debido a su bajo costo en relación con otros fertilizantes nitrogenados y alto contenido de N (48%). La utilización de cristales de CIU que son prácticamente insolubles en agua pero que en contacto con el suelo liberan paulatinamente fuentes nitrogenadas que pueden ser utilizadas por las plantas, implica que este complejo puede ser utilizado como fertilizante nitrogenado de liberación lenta. La liberación lenta del N disminuye el riesgo de volatilización en forma de amoníaco cuando la urea entra en contacto con el suelo, durante los primeros días. Al poner al nitrato y amonio en disponibilidad más lentamente aumenta la probabilidad de que las raíces de las plantas y los microorganismos consuman dichas formas nitrogenadas, y por lo tanto se reduce la probabilidad de lixiviación hacia las napas, además de hacer más efectiva la aplicación del fertilizante.

Grado de demanda (máximo 250 palabras):

La preocupación de la sociedad por el cuidado del ambiente, pone en debate el uso de agroquímicos en general, y [fertilizantes nitrogenados](#) en particular. La contaminación del [aire](#), el [suelo](#), los [cuerpos de agua](#) y las [napas](#) por fertilizantes es una preocupación de los ambientalistas. Se han elaborado [guías para la producción de fertilizantes](#) que contemplan los aspectos ambientales. Por otro lado, las pérdidas por volatilización y lixiviación reducen la eficiencia de la fertilización, con un costo económico: se gasta dinero en comprar y aplicar un fertilizante que no es utilizado por el cultivo. Es así, que surge la demanda de los “[fertilizantes inteligentes](#)” que minimicen los impactos negativos al ambiente y abastezcan a los cultivos de los nutrientes necesarios en el momento justo.

Desarrollo del producto

Síntesis del CIU

La formación de los complejos de inclusión se basa en que la urea en presencia de cadenas lineales de hidrocarburos y/o ácidos orgánicos forma cristales hexagonales, tipo agujas, con canales internos que hospedan a las moléculas anteriormente mencionadas (Zimmerschied et al. 1950, Hayes 2006). Esta técnica ha sido utilizada desde hace décadas para el fraccionamiento continuo de mezclas de ácidos grasos (aceites vegetales), separando ácidos grasos de distintos grados de saturación mediante la formación de complejos de inclusión con urea en presencia de un disolvente (Redlich et al. 1950). Estos complejos de inclusión están formados por dos subestructuras distintas, aunque no independientes, una subestructura huésped “Host substructure” y otra invitada “Guest substructure” (Harris y Thomas, 1990, Smith 1952). Según estos autores, el resultado de un complejo de inclusión de urea (CIU) consiste de una serie de anillos hexagonales paralelos

(canales lineales), formados mediante puentes de hidrógeno entre las moléculas de urea y entre esta y la cadena carbonada lineal del compuesto incluido en el canal interior. El diámetro interno de los canales puede oscilar entre 0,55 y 0,58 nm. Aunque estos compuestos han sido estudiados desde hace mucho tiempo para separar ácidos grasos de una mezcla, hay todavía un interés considerable en el fenómeno de la inclusión. La limitación histórica de los complejos de inclusión con urea ha sido su síntesis, siendo circunscriptos a moléculas lineales. El impulso que han tenido estos complejos en los últimos años se debe a que moléculas como el ácido esteárico pueden actuar como endocitos rápidamente aducibles (RAE ,Rapidly Adductible Endocyte), es decir las cadenas orgánicas lineales cambian su conformación y endocitan o incluyen a otras moléculas. Estos endocitos permiten la inclusión en urea de terceras moléculas complejas no lineales, con bioactividad farmacológica, mejorando la tasa de disolución en fluidos corporales y por ende, su bioactividad (Arora et al. 2009, Arora et al. 2010, Ohlan et al 2008, Selvaraju et al. 2003, Thakral y Madan 2008).

La técnica para su obtención es relativamente sencilla. Inicialmente se realizan dos soluciones metanólicas, una de urea y otra de ácido esteárico. Posteriormente, mediante calentamiento y agitación se agrega la solución de ácido esteárico a la de urea, y se lo deja enfriar lentamente. Luego de unos minutos se pueden observar los cristales de inclusión (Figura 1) a simple vista, y también se puede corroborar su solubilidad en agua, aunque posteriormente se deben utilizar diferentes técnicas complementarias para determinar la formación del complejo de inclusión (por ejemplo, DSC: Differential scanning calorimetric studies, FTIR: Fourier transforms infrared spectroscopy, SEM: Scanning Electron Microscopy, EDAX: Energy-dispersive X-ray spectroscopy microanalysis, entre otras) y la presencia y cantidad de urea en el complejo. Nosotros mediante espectroscopia Raman hemos determinado que la cantidad de urea presente en el CIU es de aproximadamente 76 ± 0.5 %. Esto significa

que los complejos de inclusión urea-ácido esteárico contienen un total de 35 % de nitrógeno, valores que coinciden con los de Paulson y Kurtz, 1969.

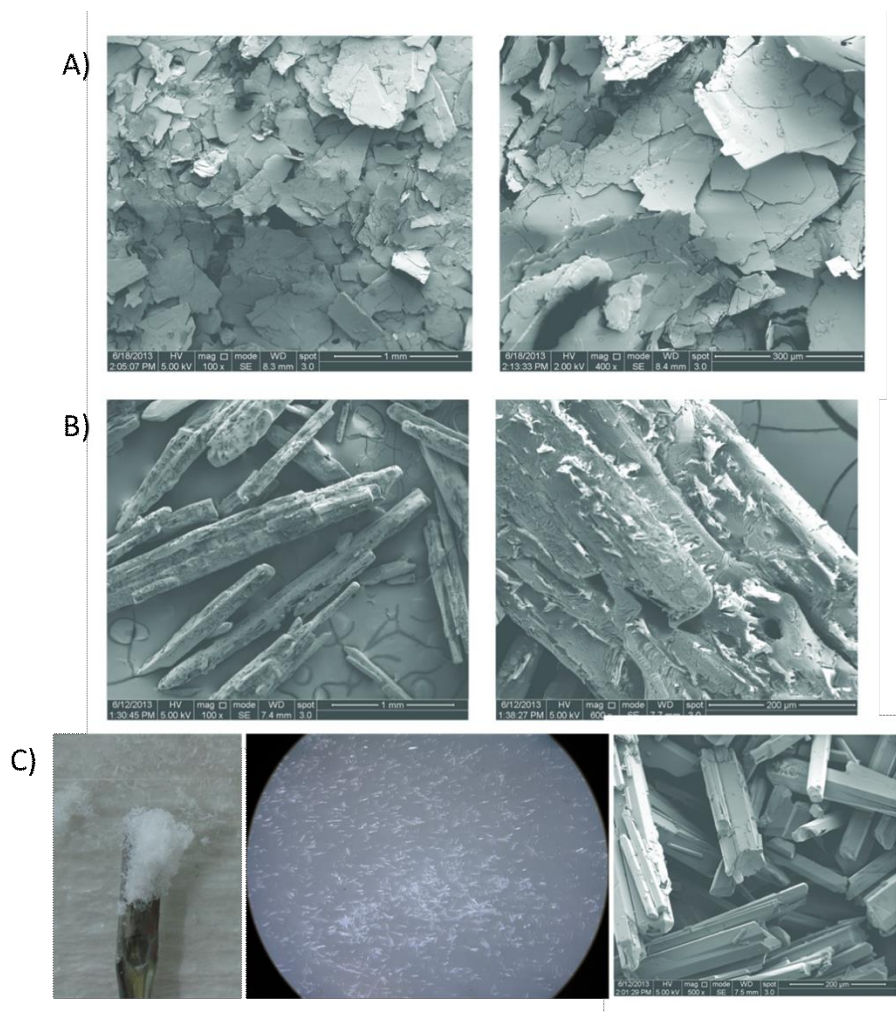


Figura 1. A) Ácido esteárico (RAE- Suitable Rapidly Adductible Endocyte) - Microfotografía tomada mediante Microscópio Electrónico de Barrido (SEM); B) Urea - Microfotografía tomada mediante Microscópio Electrónico de Barrido (SEM); C) CIU – Izquierda y centro: Fotografía con lupa binocular. Derecha: Microfotografía tomada mediante Microscópio Electrónico de Barrido (SEM) (Fuente: Lucia et al. 2014)

Figure 1. A) Stearic acid (RAE- Suitable Rapidly Adductible Endocyte) - Microphotograph taken by Scanning Electronic Microscope (SEM); B) Urea - Microphotograph taken by Scanning Electronic Microscope (SEM); C) CIU – Left and center: photograph taken by binocular lupe. Right: Microphotograph taken by Scanning Electronic Microscope (SEM) (Source: Lucia et al.

Evaluación del CIU en contacto con suelo

Se colocó CIU en contacto con suelo, y se midió durante los primeros 8 días la liberación al lixiviado de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+). Se comparó la liberación con respecto al suelo con adición de urea, tomando el suelo sin fertilizar como referencia. Para eso se colocó una cantidad fija de suelo en microlisímetros, con una malla metálica en la base del recipiente, de manera que pase el líquido, pero no el suelo. Se hizo percolar una cantidad fija de agua destilada 1, 3 y 8 días después de la aplicación de urea o CIU. El líquido se recolectó luego de pasar por el suelo y se determinó la concentración de nitrato (Cataldo et al. 1975) y amonio (método clásico de *Nessler*, *Standard Methods* 1975).

Se observó que el CIU liberó levemente más amonio que la urea (Figura 2). El primer producto de la acción de las ureasas es la liberación de amonio, que ocurre durante la primera semana (Rodrigues Soares et al. 2012). Esto demuestra que el CIU es atacado por los microorganismos o enzimas ureasas presentes en el suelo.

Asimismo, durante los primeros 8 días no hay liberación de nitrato, al contrario. En el lixiviado la concentración de nitrato es menor que en el suelo sin aplicación de fertilizante, lo que se puede apreciar por los valores negativos de la lixiviación de nitrato al suelo (Figura 2). Esta disminución en la concentración puede deberse a que la adición del CIU, el ácido esteárico que lo compone es una fuente carbonada lábil, que puede servir de fuente para el crecimiento de los microorganismos, que demandan más nitrato del disponible en el suelo (Meng et al. 2020), y por lo tanto la disponibilidad de nitrato en la solución del suelo es menor si se aplica CIU que en el suelo no fertilizado.

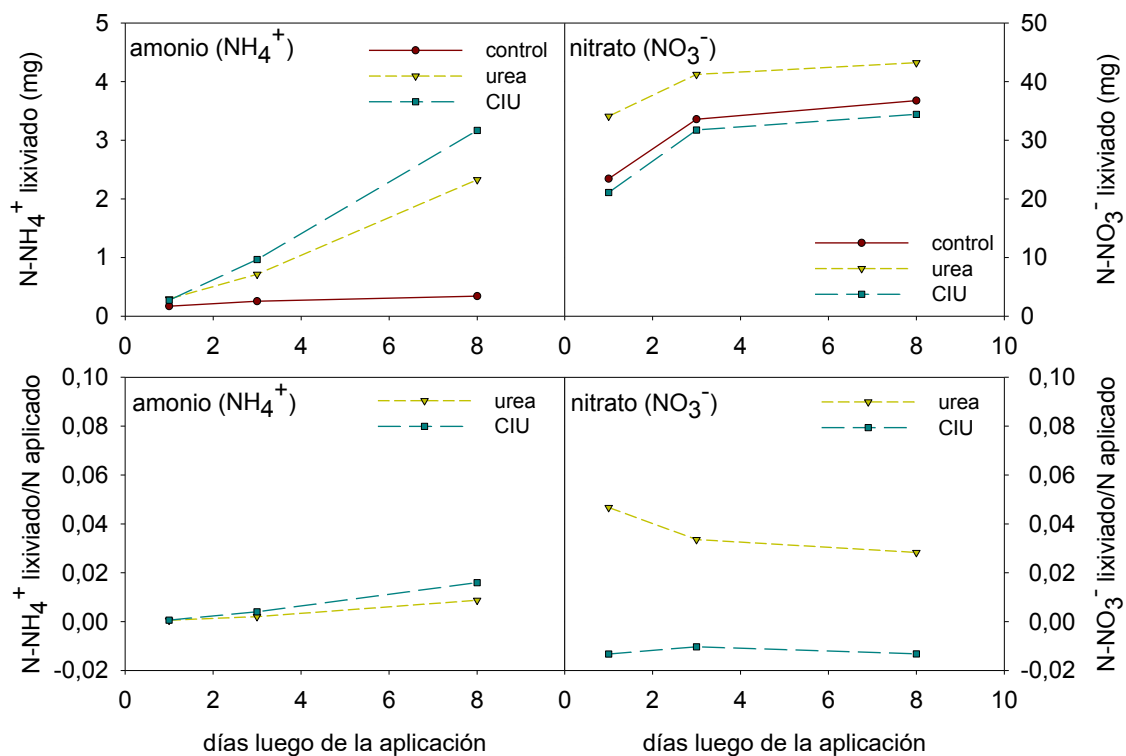


Figura 2. Liberación de amonio (NH₄⁺) y nitrato (NO₃⁻) en el lixiviado del suelo durante los primeros 8 días posteriores a la aplicación de CIU o urea. En los paneles superiores se indica la cantidad de N lixivada en suelo no fertilizado (control) y en suelo en el que se aplicó urea o CIU. En los paneles de abajo, se indica la proporción del N lixivado con respecto al aplicado. Los valores negativos indican que la concentración es menor que la del suelo sin fertilizar. El CIU es atacado por los microorganismos o enzimas presentes en el suelo.

Figure 2. Lixiviation of ammonium (NH₄⁺) and nitrate (NO₃⁻) to soil solution along 8 days after the application of CIU or urea. Upper panels: the amount of N in the lixivate is shown in non fertilized soil (control) and in soils fertilized with urea or CIU. In the lower pannels, the proportion of N lixivaited respect to the aount of N applied is shown. Negative values means that concentration is lower than in unfertilized soil. CIU is attcked by microorganismos or free enzymes present in the soil, as NH₄⁺ is realized.

Dada que la concentración en el suelo de nitrato es mayor que la de amonio, y que el nitrato es la principal fuente de nitrógeno para las plantas, se evaluó la

concentración en el lixiviado de nitrato, a lo largo de 90 días posteriores a la fertilización. Se observó que la inmovilización de nitrato duró alrededor de 10 días, y luego su disponibilidad fue mayor que en los suelos no fertilizados (valores mayores a cero, que representan el suelo sin fertilizar), de manera que a los 90 días, el 6% del N aplicado como CIU fue liberado al lixiviado, mientras que el 12% del N aplicado como urea fue liberado en el mismo lapso (Figura 3). Esto confirma que el CIU aporta nitrato al suelo, a una velocidad más lenta que la urea, por lo que puede utilizarse como fertilizante de liberación lenta.

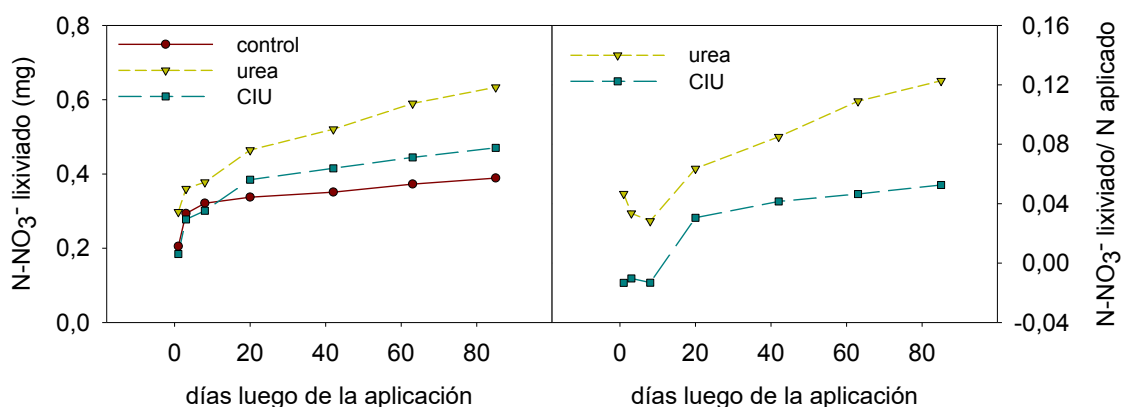


Figura 3. Liberación neta de nitrato (NO₃⁻) en el lixiviado del suelo durante los primeros 90 días posteriores a la aplicación de CIU o urea. Los valores negativos en el panel de la derecha indican que la concentración es menor que la del suelo sin fertilizar.

Figure 3. Net lixiviation of nitrate (NO₃⁻) to soil solution along 90 days after the application of CIU or urea. Negative values indicate that N concentration in fertilized soil is lower than in unfertilized soil.

Posteriormente evaluamos la volatilización de N en forma de amoníaco. Para eso colocamos suelo en frascos cerrados herméticamente, con trampa para recuperar amoníaco (adaptado de Watanabe et al., 2009). Cada 48/72 horas se tomaron las muestras. Se observó que hasta los 25 días de aplicado el fertilizante, la

volatilización de amonio fue similar en suelo fertilizado con CIU o con urea, pero luego la tasa de volatilización de amonio es mayor en suelo fertilizados con CIU, y a los 40 días de aplicados los fertilizantes, aproximadamente el 3% del N aplicado se perdió por volatilización de amoníaco cuando se aplicó CIU, mientras que la volatilización fue del 1,5% cuando se aplicó urea, tanto en suelo seco como húmedo (Figura 4).

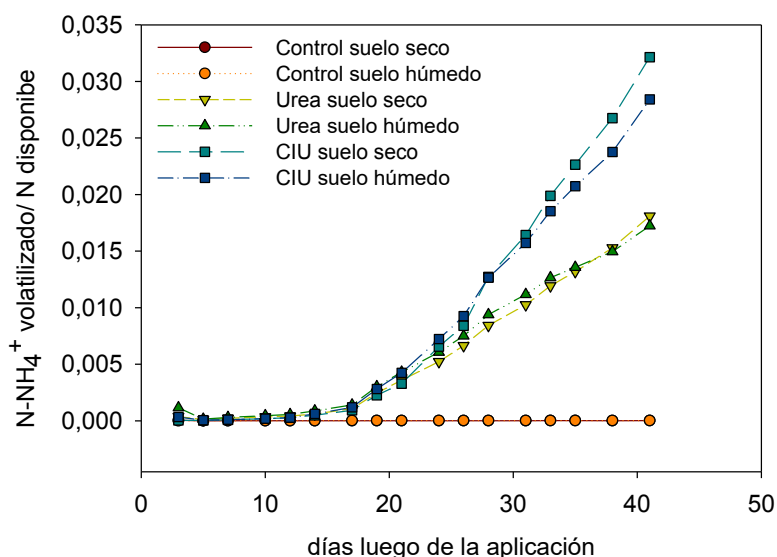


Figura 4. Volatilización de amonio(NH₄⁺) durante los primeros 42 días posteriores a la aplicación de CIU o urea.

Figure 4. Ammonium volatilization (NH₄⁺) along 42 days after the aplicaion of CIU or urea.

Por un lado, la menor humedad en el suelo no incrementó la volatilización de amonio, como podría esperarse, posiblemente debido a que la temperatura ambiente no fue tan elevada y el contenido de humedad del suelo no fue tan bajo como en situaciones en las que se registró mayor volatilización en suelos secos (Duarte et al. 2007, Fontoura y Bayer 2010). Por otro lado, la mayor pérdida de amonio cuando se aplica CIU en comparación con urea puede deberse justamente a la liberación lenta que ocurre. Cuando se aplica urea, se produce un pico elevado

de emisión de amoníaco, pero luego todo el N disponible en el suelo pasa a forma de nitrato y es absorbido por plantas y microorganismos (Barbieri y Saínz Rozas 2018). El hecho de que el CIU es un complejo que es paulatinamente roto por los microorganismos, alarga el periodo de emisión de amoníaco. Este punto es importante tenerlo en cuenta, ya que este CIU no sería recomendable en situaciones donde la volatilización puede ser mayor, como altas temperaturas, suelos secos y ambientes ventosos. Sin embargo, estos resultados deben ser evaluados con la presencia de plantas que consuman el nitrato y el amonio, porque estas pérdidas podrían ser pequeñas si no se produce la acumulación de estas formas inorgánicas en el suelo.

Concluimos que los cristales de CIU pueden ser utilizados como fertilizantes en el suelo, porque, aunque no son solubles en agua, son atacados por los microorganismos y enzimas del suelo, y el amonio es liberado. Si bien una fracción se volatiliza, gran parte es transformado a nitrato, que es la principal fuente de N para las plantas. Una ventaja adicional del CIU es que su estructura cristalina permitiría incluir al CIU otras moléculas en su interior. De esa manera, se podrían construir cristales fertilizantes, que podrían contener micronutrientes o moléculas orgánicas como hormonas, insecticidas o fungicidas.

Financiamiento

Este proyecto fue financiado por el Proyecto I+D de la Universidad Nacional de La Plata 11/A242 y por el proyecto PICT 2012-2453, denominado "Síntesis de complejos de inclusión de urea con acción insecticida o repelente para el control de *Aedes aegypti*, vector del dengue" (Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica.

Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica - FONCYT (Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica).

Agradecimientos

AL agradece en particular al INTI-Plásticos - Instituto Nacional de Tecnología Industrial por la colaboración prestada para el análisis de resultados referentes a los complejos, como así también hace extensivo el agradecimiento al Servicio de Microscopía de Barrido (SEM) del INTI. Por otro lado, un agradecimiento especial al Laboratorio de Materia Blanda del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA (UNLP/CONICET)) por el desarrollo de la técnica para determinar la concentración de urea en las muestras.

Referencias bibliográficas

Abalos D, Jeffery S, Sanz-Cobena A, et al (2014) Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 189:136–144. doi: 10.1016/j.agee.2014.03.036

Arora SC, Sharma PK, Irchhaiya R, Khatkar A, Singh N, Gagoria J (2010) Urea Based Inclusion Compounds of Cepodoxime Proxetil For The Improvement of Pharmaceutical characteristics. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. Vol 2, Issue 2.

Arora SC, Sharma PK, Irchhaiya R, Khatkar A, Singh N, Gagoria J (2009) Urea Based Inclusion Compounds Of Azithromycin Dihydrate For The Improvement Of Pharmaceutical Characteristics. *International Journal of Pharma Recent Research* Vol 1, No. 1. ISSN 0975-783X. 1(1), 41-48.

Barbieri PA, Echeverría HE, Saíenz Rozas HR (2018) Pérdidas por volatilización y eficiencia de uso de nitrógeno en maíz en función de la fuente, dosis y momento de aplicación. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 117:111–116. <https://revistas.unlp.edu.ar/revagro/article/download/7323/6192/>

Boccolini MF (2016) Impacto de la aplicación prolongada de urea sobre la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco en un suelo argiudol típico de Argentina. Universidad Nacional de Córdoba. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 95 pp. <http://hdl.handle.net/11086/4828>

Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun Soil Sci Plant Anal 6:71–80

Duarte, Francisco Mendoza, Pocojeski, Elisandra, Silva, Leandro Souza da, Graupe, Fabio Adriano, Britzke, Darines. (2007). Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia com aplicação de uréia em solo de várzea com diferentes níveis de umidade. Ciência Rural, 37(3), 705-711. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300016>

Ferraris G, Cauret L, Toribio M (2009) Pérdidas de nitrógeno por volatilización y su implicancia en el rendimiento del cultivo de maíz: efectos de fuente, dosis y uso de inhibidores. Informaciones Agronómicas 43:19–22

Fontoura, Sandra Mara Vieira, Bayer, Cimélio. (2010). Ammonia volatilization in no-till system in the south-central region of the State of Paraná, Brazil. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 34(5), 1677-1684. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000500020>

Harris KDM y Thomas JM (1990) Structural aspects of urea inclusion compounds and their investigation by X-ray diffraction: a general discussion. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 86, 2985 (1990).

Hayes DG (2006) Purification of free fatty acids via urea inclusion compounds, en

Handbook of Functional Lipids, Capítulo 4. En Handbook of Functional Lipids. Pp 77-88. Taylor & Francis Group. Editado por C.C. Akoh, CRC Press, Boca Raton, FL.

Lucia A, Lorenzo C, Eisenberg P, Zerba E, Masuh H (2014) Proyecto ID 16460: Síntesis de complejos supramoleculares de inclusión UREA-RAE-METOPRENE con actividad larvícida sobre *Aedes aegypti*, mosquito vector del dengue. Concurso Nacional de Innovaciones - INNOVAR 2014. Categoría Investigación Aplicada - 10^o edición. Villa Martelli. Buenos Aires, Argentina. Pág. 67. Catálogo de INNOVAR 2014.

Meng C, Tian D, Zeng H, et al (2020) Global meta-analysis on the responses of soil extracellular enzyme activities to warming. *Science of The Total Environment* 705:135992. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135992>

Ohlan R, Narasimhan B, Ohlan S, Narang R, Judge V (2008) Synthesis and antimicrobial evaluation of urea inclusion complexes. *Org. Commun.* 1:2 24-32.

Paulson KN y Kurtz LT (1969) Evaluation of Urea-Hydrocarbon Complexes as "Slow Release" Nitrogen Carriers. *Soil Science Society of America Journal*, 33(6), 973-973. doi:10.2136/sssaj1969.03615995003300060047x.

Redlich O, Gable CM, Dunlop AK, Millar RW (1950) Addition compounds of urea and organic substances. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4153-4160.

Rodrigues Soares J, Cantarella H, Menegale ML de C (2012) Ammonia volatilization losses from surface-applied urea with urease and nitrification inhibitors. *Soil Biology and Biochemistry* 52:82-89. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.04.019

Selvaraju C, Thiagarajan C, Ramamurthy P (2003) Interaction of 1,8-acridinedione dye with urea dimer in methanol. *Chemical Physics Letters* 379 (2003) 437-442.

Smith AE (1952) The crystal structure of the urea-hydrocarbon complexes. *Crystallographica*, 5(2), 224-235. doi:10.1107/s0365110x52000629.

Standard Methods (1975) American public health association, American water works

association, and Water pollution control federation, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th edition.

Watanabe T, Son TT, Hung NN, Truong NV, Giau TQ, Hayashi K, Ito O (2009) Measurement of ammonia volatilization from flooded paddy fields in Vietnam, Soil Science and Plant Nutrition, 55:6, 793-799, <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2009.00419.x>

Thakral S y Madan AK (2008) Urea co-inclusion compounds of glipizide for the improvement of dissolution profile. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 60, Issue 3-4, 203-209.

Watson CJ, Akhonzada NA, Hamilton JTG, Matthews DI (2008) Rate and mode of application of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ammonia volatilization from surface-applied urea. Soil Use and Management 24, 246-253 <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2008.00157.x>

Zimmerschied WJ, Dinerstein RA, Weitkamp AW, Marschner RF (1950) Crystalline adducts of urea with linear aliphatic compounds. J. Ind. Eng. Chem. 42, 1300-1306.