

CAPÍTULO 1 ÁREA ALIMENTOS

NANOESEFERAS POLIMÉRICAS CONTENIENDO NUTRIENTES PARA SU APLICACIÓN EN CULTIVO DE (*LACTUCA SATIVA*)

**Aleana Ledezma-Delgadillo, Fabiola Mallon-Mercado,
Jaime-Fonseca, Mónica Rosalía*, Eduardo San Martín-Martínez**

Instituto Politécnico Nacional - Centro de Investigación en Ciencia Aplicada
y Tecnología Avanzada del, Legaria 694, Col. Irrigación, C.P. 11500, CDMX,
México.

monikjf04@hotmail.com

<https://doi.org/10.3926/oms.404.1>

Ledezma-Delgadillo, A., Mallon-Mercado F., Fonseca-Jaime, Rosalía, M.,
& San Martín-Martínez, E. (2020). Nanoesferas poliméricas conteniendo
nutrientes para su aplicación en cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). En E.
San Martín-Martínez (Ed.). *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y
Nanotecnologías. Volumen II*. Barcelona, España: OmniaScience. 13-28.

Resumen

En este trabajo se nanoencapsuló urea en una matriz de quitosano (QS), para reducir la cantidad de urea empleada en el cultivo de lechuga sembrada en suelo. El tamaño de las nanocápsulas con y sin urea fue determinado por MEB y DLS. La carga o potencial zeta de las nanocápsulas fue analizada empleando un nanozetasizer. Los resultados de MEB indicaron que las esferas sin urea presentaron un tamaño de 250 ± 50 nm con potencial Z de 25.00 ± 0.96 mV y con urea de $500 \text{ nm} \pm 50$ debido a la adición de urea un potencial de 17.10 ± 2.56 mV. La cantidad de urea utilizada como fertilizante en las nanoesferas fue únicamente del 30 % del total empleado en el cultivo control. Las lechugas nutridas con las nanoesferas de quitosano con urea tuvieron una altura 32 % mayor en la roseta comparadas con el cultivo control. No se observó una diferencia significativa en la elongación de la raíz y el diámetro de la roseta. La cantidad de nitrógeno en la raíz de las lechugas nutridas con las nano esferas fue 5 % menor que en el tratamiento control.

Palabras clave: Nanomateriales; Nanofertilizantes; Biopolímeros; Quitosano; Urea.

1. Introducción

El elevado consumo de fertilizantes en el rubro agrario y los efectos secundarios que estos generan han llevado a realizar investigaciones relacionadas con el desarrollo de fertilizantes que sean amigables al medio ambiente y aprovechados íntegramente por la planta a la que se le nutre. Es indudable que se piense en diferentes opciones a la agricultura convencional cuando actualmente el suelo agrícola ha disminuido en hectáreas cultivables tanto en disponibilidad como en rendimiento, elevando los costos de producción, lo cual se ve reflejado en la economía actual.

El mayor problema en la fertilización de los suelos es la pérdida del nitrógeno utilizando la urea como el mayor fertilizante nitrogenado porque tiene mayor contenido de N_2 (46 %), fácil de manejar y bajo costo. Sin embargo, cerca del 40 a 70 % del nitrógeno se pierde en el ambiente y no puede ser absorbido en los cultivos, lo cual no solo causa pérdidas económicas sino también serios problemas de contaminación [1]. Debido a lo anterior, se buscan opciones para disminuir las pérdidas de fertilizantes nitrogenados y que no dañen el ambiente. La nanotecnología es una opción, que en conjunto con el desarrollo de compuestos biopoliméricos, pueden contribuir en la protección de fertilizantes nitrogenados que se pierden por procesos fisicoquímicos que ocurren en el suelo, favoreciendo la disminución del uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados y reduciendo las pérdidas económicas que produce el sector agrícola. Existen algunos trabajos científicos donde se ha reportado que el quitosano (QS), aumenta la velocidad de crecimiento y germinación de la planta [2-4]), el incremento en el contenido de clorofila, ampliación de cloroplastos en las hojas de las plantas [5], incremento de nódulos en la fijación de nitrógeno de la familia de las leguminosas [6], incremento en la absorción de nutrientes y reducción en el estrés de las plantas y mayor rendimiento en los cultivos. [7] reportaron que, al adicionar una solución en aerosol de quitosano en las raíces de las orquídeas, las flores estimularon su crecimiento y existió renovación en la producción de sus flores y otros efectos benéficos. La nanoencapsulación con QS que contiene micronutrientes esenciales como Hierro, Zinc y Molibdeno o sustancias promotoras de crecimiento que son las hormonas vegetales, agregadas foliarmente, también podrían en un futuro, aumentar el rendimiento de los cultivos, y ayudar en la resistencia a ataques bióticos o abióticos que inducen enfermedades en las plantas.

Las nanopartículas poliméricas son capaces de internarse en las células de las plantas y las hojas, y también puede transportar ADN y productos químicos en las células vegetales. Esta área de investigación ofrece nuevas posibilidades en la biotecnología vegetal para dirigir genes específicos de manipulación y expresión en las células específicas de las plantas [8]. De acuerdo a investigaciones previas, la capacidad de las plantas para recolectar una mayor cantidad de energía luminosa, puede aumentarse mediante la entrega de nanotubos de carbono en el cloroplasto, y también los nanotubos de carbono podrían servir como antenas artificiales que permiten al cloroplasto capturar longitudes de onda de luz que no están en su rango normal, y el infrarrojo cercano [9], estos también aumentan la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas [10-11].

La liberación del ingrediente activo de las nanopartículas de quitosano dependerá de diferentes factores: la morfología, tamaño, densidad, grado y velocidad de reticulación de las nanopartículas de quitosano y las propiedades fisicoquímicas del activo. En general, la nanoencapsulación con quitosano en la agricultura puede tener un futuro prometedor aumentando la productividad de los cultivos de manera constante y amigable con el medio ambiente. Otro material de pared es la maltodextrina (MD) que más comúnmente se utiliza como material de encapsulación de moléculas bioactivas debido a su bajo costo y eficacia. La MD es un material soluble en agua, capaz de proteger el ingrediente encapsulado de la oxidación. Algunos estudios han explorado el uso de la MD para proteger compuestos sensibles como la vitamina C en zumo de fruta y para aumentar la estabilidad del producto en polvo de acerola [12]. El principal objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de alimentar un cultivo de lechuga con nanoesferas de quitosano y ácido metacrílico, con urea embebida en la matriz del biopolímero.

2. Materiales y métodos

La experimentación se dividió en tres etapas: a) síntesis y caracterización de las nanoesferas, b) preparación y crecimiento del cultivo de lechuga y c) evaluación de las lechugas.

2.1. Síntesis de nanoesferas

Las nanoesferas de quitosano y ácido polimetacrílico se elaboraron de acuerdo con el método reportado por [13], estudiando los factores de concentración de quitosano, ácido polimetacrílico que varía de 0.27 a 1.0 % en los dos polímeros y la temperatura de reacción entre 65 a 80 °C.

El proceso de síntesis fue diluir 10 mg de Urea en 25 mL de agua desionizada y se agitó durante una hora, después se adicionó a la solución de nanoesferas y se agitó durante 6 horas, se centrifugó a 4500 rpm durante 30 minutos [14].

La suspensión de nanoesferas fue caracterizada para obtener su tamaño, morfología, pH, potencial zeta y tamaño hidrodinámico.

2.2. Tamaño de partícula de QS-AMA por dispersión de luz dinámica

El diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad, fue determinado por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) el cual se basa en la teoría browniana en un equipo de Nano Zetasizer (Malvern Instruments, UK). El análisis se realizó, partiendo de 0.1 g de la muestra liofilizada de nanoesferas que fueron diluidas en 20 mL de agua desionizada. De la muestra diluida se tomaron 2 mL en una cubeta de cuarzo de 3 mL y se determinó el tamaño y la polidispersidad o distribución de nanopartículas en el Nano Zetasizer, todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

2.3. Potencial Z

El potencial Z de las nanoesferas fue determinado en el equipo de Nano Zetasizer (Malvern Instruments, UK), a través del velocímetro láser Doppler. Las muestras de igual manera se diluyeron, 43µL de la suspensión de nanoesferas en una solución con 10 mL de agua desionizada y se colocaron en una celda para medir potencial Z, la cual tiene 2 electrodos por donde atraviesa un potencial eléctrico permitiendo determinar la carga de superficial de la partícula. El volumen necesario para la prueba fue de aproximadamente 800 µL.

2.4. Morfología y tamaño de las nanoesferas

La morfología y la distribución de tamaños de las nanoesferas con y sin urea incorporada, fueron evaluadas empleando un Microscopio Electrónico de Barrido JEM-6390 LV (Jeol, Japón) y un voltaje de aceleración de 20kV. Las muestras fueron diluidas 50 µl en 150 µl de agua desionizada, tomando una gota de la muestra fueron montadas sobre porta muestras metálico recubierta con una lámina de carbono adhesiva de ambas caras, después de deshidratarse, las muestras

fueron recubiertas con oro bajo condiciones de vacío por un proceso de *sputtering* (Desk IV, Denton Vacuum). En cuanto a la distribución de tamaño se analizaron 150 nanoesferas por cada muestra, empleando un software de diseño para la medición ImageJ.

2.5. Preparación y crecimiento del cultivo de lechuga

Las semillas de lechuga se germinaron en sustrato de vermiculita y turba en un almácigo hasta su etapa de plántula, adicionando una dosis de nanoesferas (10 μ L) en la primera semana de su crecimiento después del ciclo de germinación. Posteriormente, la plántula se sembró en suelo con protección de invernadero. El suelo se preparó con una solución nutritiva de macronutrientes y micronutrientes formulada por [15]. Se realizó un diseño experimental para el cultivo de las lechugas en suelo natural, así como 4 tratamientos: cultivo control, cultivo con ausencia de Nitrógeno, cultivo con ausencia de nitrógeno y adición de nanoesferas de quitosano, cultivo con adición de nanoesferas de quitosano que contienen urea. Todos los tratamientos contenían la misma cantidad de micronutrientes y macronutrientes de fósforo y potasio.

2.6. Evaluación de las lechugas

Se escogieron 7 muestras de cada tratamiento para evaluar las características fenológicas de las plantas de lechuga cultivadas en suelo natural; como: peso total fresco, peso fresco del follaje o roseta, peso fresco de la raíz, elongación de la raíz, altura del follaje o roseta, diámetro de la roseta, peso seco de la roseta, peso seco de la raíz.

3. Resultados y discusión

3.1. Interacción de los polímeros quitosano y ácido polimetacrílico a diferentes pH.

En la Figura 1 se muestra el efecto del pH sobre el potencial ζ de los materiales poliméricos. En la solución acuosa de QS con la adición de hidróxido de sodio la superficie empezó a ser rodeada por el ion hidroxilo (OH⁻). Esto conlleva al aumento de pH de la solución y a la disminución de cargas positivas de

los grupos amino en la superficie de la solución de quitosano (Figura 2). Como resultado, los valores de potencial ζ de QS y la densidad de carga positiva de las cadenas poliméricas de QS disminuyeron gradualmente, además de la fuerza iónica del medio acuoso [16-18]. Por lo tanto, el potencial ζ de QS está directamente relacionado con la cantidad de iones de NH_3^+ de las cadenas de QS. Por consiguiente, entre más iones NH_3^+ se mantengan estables, el pH del polímero aumentará. Como lo menciona Boddohi et al. [19] que tuvo resultados similares, concluyendo que si la densidad de carga de las cadenas disminuye el pH de la solución se incrementará.

Cuando se añadió la solución de NaOH a la muestra de ácido polimetacrílico el pH de la solución fue incrementando paulatinamente (Figura 2). El aumento del pH en la solución del ácido polimetacrílico se debe al grupo funcional del ácido carboxilo ($-\text{COOH}$) que se encuentra en la cadena del polímero ya que los ácidos tienen la característica principal de ceder protones en solución en una reacción reversible de ionización como la siguiente: $\text{R-COOH} \rightarrow \text{R-COO}^- + \text{H}^+$, produciendo un grupo éster.

Para lograr una mayor interacción de los polímeros el pH se ajustó entre 5 y 7. En este intervalo de pH, el valor de potencial ζ para el ácido metacrílico se encuentra entre valores de -10mV a -16mV y para el quitosano entre 20 a 28mV . Estos resultados favorecieron la formación de nanoesferas como se muestra en la Figura 2, ya que al combinar estos polímeros existe una diferencia de potencial con carga positiva que se debe al quitosano. Esta diferencia de carga positiva puede atraer los iones nitrato que se requieren para el crecimiento de los cultivos.

Sin embargo, el potencial Z depende de la concentración de los polímeros, la temperatura a la que son expuestos y el tipo de solvente empleado como lo menciona Carneiro-da-Cunha et al. [20].

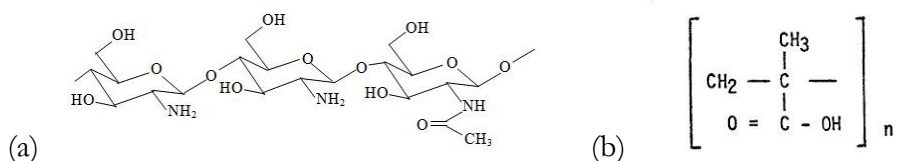


Figura 1. Estructura química de: (a) monómero del quitosano, (b) monómero del ácido polimetacrílico.

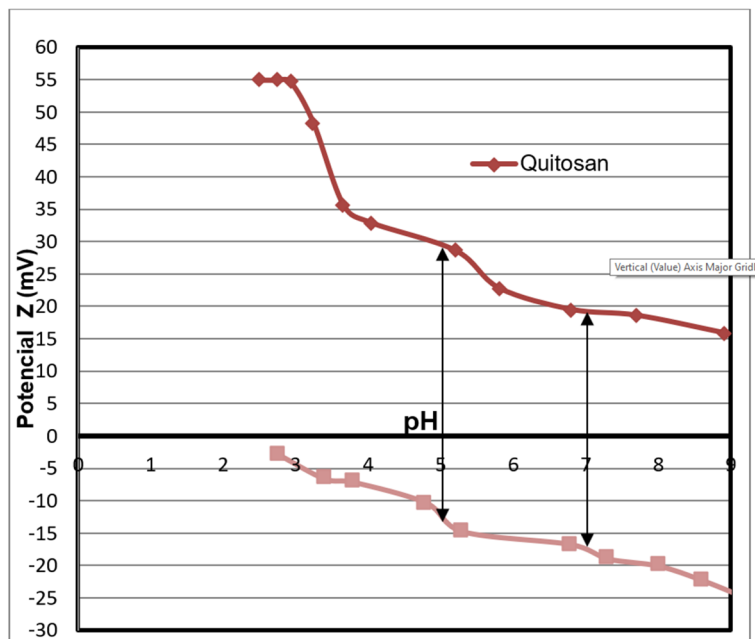


Figura 2. Interacción de quitosano y ácido polimetacrílico a diferentes pH.

3.2. Tamaño de nanoesferas

Las nanoesferas de quitosano evaluadas por SEM (Figura 3a), mostraron una morfología esférica y un tamaño promedio de 250 ± 50 nm con potencial Z de $25.00 (\pm 0.96)$ mV. Las nanoesferas de quitosano y ácido polimetacrílico con urea (Figura 3b) mostraron también morfología ovoide y un aumento en el tamaño promedio 500 nm ± 50 debido a la adición de urea un potencial de $17.10 (\pm 2.56)$ mV.

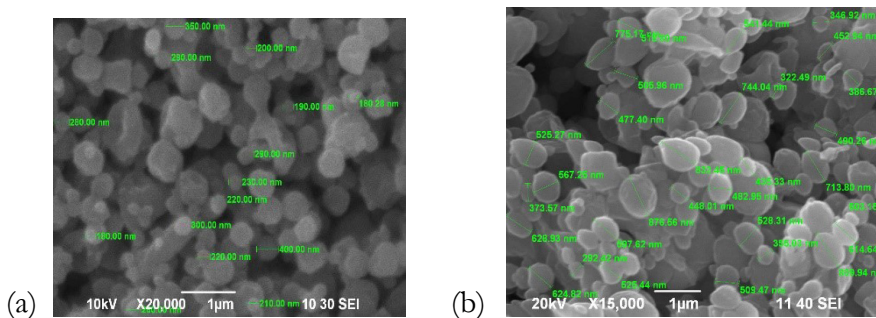


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de (a) nanopartículas de quitosano sin urea, (b) nanopartículas de quitosano con urea.

3.3. Caracterización de las lechugas

La evaluación del cultivo de lechuga en suelo mostró un aumento en algunas características fenológicas del producto al adicionar las nanoesferas de quitosano con urea. En la Figura 4, se observan las lechugas de los cuatro tratamientos después de 40 días de crecimiento a partir de plántula.

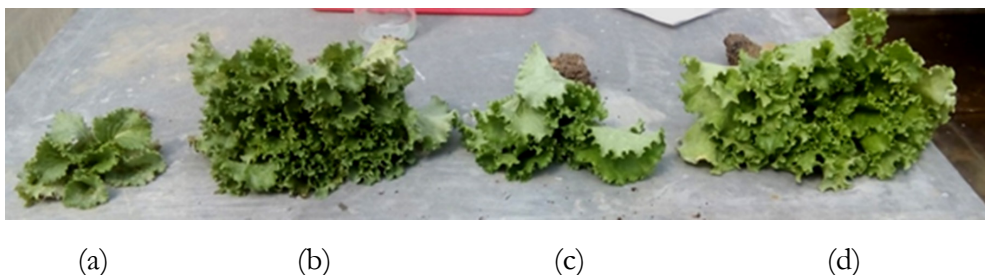


Figura 4. Muestra de lechuga después de 40 días de crecimiento, (a) tratamiento sin fuente de nitrógeno (b) tratamiento control (c) tratamiento con nanoesferas de quitosano como fuente de nitrógeno (d) tratamiento con nanoesferas de quitosano que contienen urea como fuente de nitrógeno.

La evaluación en cuanto a tamaño de la roseta y el número de hojas de las lechugas cultivadas con nanoesferas conteniendo urea, tuvieron un mejor crecimiento comparado con la lechuga control que se cultiva con los nutrientes convencionales, y cuando se emplea solo el quitosano como fuente de nitrógeno el desarrollo fue muy pobre casi similar a la lechuga cultivada solo con agua. Para mayor explicación del desarrollo de los cultivares se presenta la Figura 5,

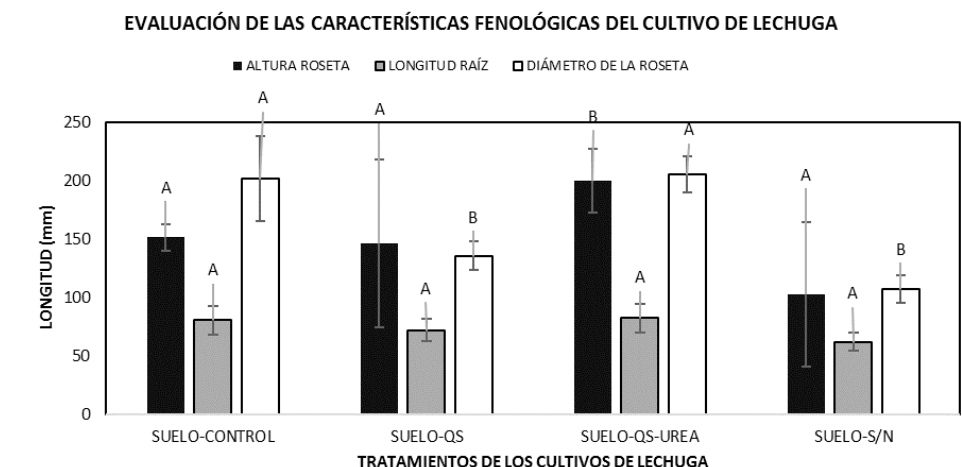


Figura 5. Comparación de las características fenológicas del cultivo de lechuga de los cuatro tratamientos.

la gráfica de la altura de la roseta de las lechugas del tratamiento que contiene las nanoesferas de quitosano con urea (QS-UREA) tiene un aumento de 32 % comparada con el control y con los demás tratamientos, la elongación de la raíz no mostró diferencia significativa entre los cuatro tratamientos, y el diámetro de roseta es similar al control y con diferencia significativa entre el tratamiento que no contiene fuente de nitrógeno y solo nanoesferas de quitosano sin urea.

En la Tabla 1 se muestra el peso fresco y seco de la roseta y de la raíz con los cuatro tratamientos para el cultivo de lechuga. El peso fresco de la roseta no mostró diferencia significativa al comparar el cultivo control con el cultivo donde se adicionaron las nanoesferas QS-UREA. Al comparar el tratamiento que solo contiene las nanoesferas de quitosano (QS) como fuente de nitrógeno y el tratamiento sin fuente de nitrógeno (S/N) son similares los resultados, pero diferentes significativamente con los otros dos tratamientos.

Tabla 1. Evaluación del peso de la roseta y la raíz en fresco y peso seco del cultivo de lechuga.

	PESO FRESCO ROSETA	PESO SECO ROSETA	PESO FRESCO RAIZ	PESO SECO RAIZ
SUELO CONTROL	70.14 $\pm$ 26.46 ^{a,c}	7.15 $\pm$ 1.71 ^a	15.29 $\pm$ 1.85 ^a	1.85 $\pm$ 0.45 ^a
SUELO QS	24 $\pm$ 14.97 ^b	1.55 $\pm$ 1.18 ^b	7.71 $\pm$ 1.66 ^{b,c}	1.66 $\pm$ 0.09 ^a
SUELO QS-N	64.71 $\pm$ 23.22 ^c	4.10 $\pm$ 1.03 ^c	8 $\pm$ 2.02 ^c	2.02 $\pm$ 0.54 ^a
SUELO SIN NITRÓGENO	15.86 $\pm$ 8.56 ^b	1.68 $\pm$ 0.27 ^d	3.71 $\pm$ 0.89 ^d	0.89 $\pm$ 0.09 ^b

La comparación de medias por Tukey (P<0.05) las letras similares indican que no se tiene diferencia significativa entre ellas y viceversa.

Estos resultados muestran la eficiencia de la administración de nutrientes nanoencapsulados de urea y el mejoramiento en ciertas características fenológicas al compararlo con el tratamiento del cultivo control, debido al quitosano que actúa como un inductor de crecimiento en ciertas propiedades físicas del cultivo de lechuga. [21] nombran al quitosano ELICITOR, compuesto bioactivo capaz de producir cambios fisiológicos y estimular la defensa o estrés inducido para evitar el ataque contra patógenos y alargar su sobrevivencia. Esto provoca la activación de una serie de mecanismos relacionados con la síntesis de fitoquímicos, dentro de los cuáles se encuentran las fitohormonas, sustancias

que aceleran o inhiben el crecimiento de las plantas. La raíz es el lugar principal donde se lleva a cabo la biosíntesis de todas ellas [22]. La interacción entre el quitosano y las membranas de los tejidos radiculares favorece estos procesos. El efecto que ocurre en el aumento de la altura puede estar relacionado con las hormonas giberelinas que promueven la elongación de las hojas de la roseta y la raíz [23-24]. Referente al peso seco de la roseta el tratamiento con las nanoesferas de quitosano con urea, absorbió mayor cantidad de agua ya que el peso seco del tratamiento fue 74 % menor que el tratamiento control. La absorción de mayor cantidad de agua puede deberse también a las nanoesferas de quitosano que pudieron intervenir en el proceso de osmosis por la disminución de solutos en las raíces y en el proceso de absorción de bombas simporte. [25] obtuvieron resultados similares al adicionar nanopartículas de quitosano vía foliar en plántulas de café.

El porcentaje de nitrógeno descrito en la Tabla 2 muestra una disminución de aproximadamente un 2 %, entre el tratamiento control y el que contiene las nanoesferas de quitosano con urea, recordemos que la cantidad que se adicionó de urea a la solución de nanoesferas fue 30 % menor que la cantidad adicionada en el tratamiento control. Además, se observa que el porcentaje de nitrógeno en el tratamiento que solo contiene las nanoesferas de quitosano comparada con el control son similares, esto puede ser por la cantidad que existe de grupos amino en el polímero de quitosano como única fuente de nitrógeno, este resultado puede servir como indicio en la absorción de nanoesferas de quitosano de las células epidérmicas de la raíz. Además, en el tratamiento donde no se añadió fuente de nitrógeno existe una cantidad mínima del 5 % aproximadamente, probablemente debido a que el suelo contenía pequeñas cantidades de nitrógeno, por lo que no fue suficiente para el crecimiento adecuado del cultivo.

Tabla 2. Porcentaje de nitrógeno en la raíz del cultivo de lechuga.

Tratamiento	Porcentaje de nitrógeno en raíz (%)
Cultivo control	10.17
Cultivo QS	10.45
Cultivo QS-UREA	8.03
Cultivo S/N	5.13

4. Conclusiones

El quitosano como material de protección y de encapsulamiento en conjunto con el ácido metacrílico, forma nanoesferas permitiendo la incorporación del fertilizante de urea. En tamaño nanoestructurado el fertilizante puede promover la biosíntesis de hormonas vegetales como el ácido giberílico y las auxinas, encargadas de la inducción de la elongación y el crecimiento radicular y en otros procesos relacionadas con la absorción de nutrientes y de agua.

La cantidad que se adicionó de urea en las nanoesferas fue 30 % menor que el tratamiento control en el cultivo de lechuga, disminuyendo el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados, derivando en un ahorro económico, disminuyendo la contaminación que provocan estos compuestos en el ambiente al aplicar excesivamente nutrientes nitrogenados en el suelo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACYT por la beca otorgada, también a la SIP y COFAA del IPN por los apoyos de la beca BEIFI y asistencia a congresos.

Bibliografía

1. Hussain R., Devi, R., & K. Maji, T.K. (2012). Controlled release of urea from chitosan microspheres prepared by emulsification and cross-linking method. *Iran Polymer Journal*, 21, 473-479. <https://doi.org/10.1007/s13726-012-0051-0>
2. Chandrkrachang, S. (2002). The application of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. En Suchiva, K., Chandrkrachang, S., Methacanon, P., Peter, M.G. (Eds.). *Advances in Chitin Science*, 458-462.
3. Li, C.F., & Wu, J.C. (1998). Chitosan benefits cultivation of vegetables. En Chen, R.H., Chen, H.C. (Eds.). *Advances in Chitin Science III*. Rita advertising Co. Ltd., 448-451.
4. Li, Y.C., & Tao, W.Y. (2009). Paclitaxel-producing fungal endophyte stimulates the accumulation of taxoids in suspension cultures of *Taxus cuspidate*. *Sci. Hort.*, 121, 97-110.
5. Luan, L.Q., Nagasawa, N., Tamada, M., Nakanishi, T.M. (2006). Enhancement of plant growth activity of irradiated chitosan by molecular weight fractionation. *Radioisotopes*, 55, 21-27. <https://doi.org/10.3769/radioisotopes.55.21>
6. Limpanavech, P., Chaiyasuta, S., Vongprommek, R., & Pichyangkura, R. (2008). Chitosan effects on floral production, gene expression and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. *Sci. Hort.*, 116(1), 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.10.034>
7. Dzung, N.A., & Thang, N.T. (2002). Effects of chitooligosaccharides prepared by enzyme degradation on the growth of soybean. En Suchiva, K., Chandrkrachang, S., Methacanon, P., Peter, M.G. (Eds.). *Advances in Chitin Science*, 463-467.
8. Wanichpongpan, P., Suriyachan, K., & Chandrkrachang, S. (2001). Effect of chitosan on the growth of gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). En T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Eds.). *Chitin and Chitosan in Life Science*, Yamaguchi, 198-201.
9. Galbraith, D.W. (2007). Nanobiotechnology: silica breaks through in plants. *Nature nanotechnology*, 2(5), 272-273. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.118>

10. Cossins, D. (2014). Next generation: nanoparticles augment plant functions. The incorporation of synthetic nanoparticles into plants can enhance photosynthesis and transform leaves into biochemical sensors. *The Scientist, News & Opinion*, 16.
11. Lahiani, M.H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A.S. et al. (2013). Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS applied materials & interfaces*, 5(16), 7965-7973. <https://doi.org/10.1021/am402052x>
12. Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., & Mohammad, F. (Eds.). (2015). *Nanotechnology and plant sciences: nanoparticles and their impact on plants*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0>
13. Righetto, A.M., & Netto, F.M. (2005). Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. *International Journal of Food Properties*, 8(2), 337-346. <https://doi.org/10.1081/JFP-200060262>
14. Ledezma Delgadillo, A., Carrillo-González R., San Martín-Martínez, E., Jaime-Fonseca, M.R., & Chacón-López, M.A. (2016). Nanocápsulas de urea en quitosano y ácido polimetacrílico y su aplicación en cultivo hidropónico de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Ingeniería de alimentos Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 423-431.
15. Corradini, E., de Moura, M.R., & Mattoso, L.H.C. (2010). A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polym. Lett.*, 4(8), 509-515. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2010.64>
16. Rodríguez-Delfín, A., H. M., & Chang, M. (2001). *Soluciones Nutritivas en Hidroponia: Formulación y preparación*. CIHNM, UNALM, Lima Perú.
17. Qi Zhao, W., Xi Guang, C., Nan, L., Shi Xi, W., Cheng Sheng, L., Xiang Hong, M. et al. (2006). Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 65, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.001>
18. Rasib S.Z.M., Ahmad Z., Khan A., Akil H.M., Othman M.B.H., Hamid Z.A.A. et al. (2018). Synthesis and evaluation on pH- and temperature-responsive chitosan-p(MAA-co-NIPAM) hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 367-375. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.021>

19. Mehmet, C., Yusuf, A., Mustafa, Y., & Unal Halil, Y. (2014). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of biodegradable conducting polypyrrole-graft-chitosan copolymer. *Applied Surface Science*, 318, 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.02.180>
20. Soheil, B., Killingworth, C.E., & Kipper, M.J. (2008). Polyelectrolyte multilayer assembly as a function of pH and ionic strength using the polysaccharides chitosan and heparin. *Biomacromolecules*, 9(7), 2021-2028. <https://doi.org/10.1021/bm8002573>
21. Carneiro-da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 522-528. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.001>
22. Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D.A. (2014). Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules*, 19(9), 13541-13563. <https://doi.org/10.3390/molecules190913541>
23. Marschener, P. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Germany. Academic Press. 672.
24. Bidadi, H., Yamaguchi, S., Asahina, M., & Satoh, S. (2010). Effects of shoot-applied gibberellin/gibberellin-biosynthesis inhibitors on root growth and expression of gibberellin biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Root.*, 4, 4-11. <https://doi.org/10.3117/plantroot.4.4>
25. Tanimoto, E. (2012). Tall or short? Slender or thick? A plant strategy for regulating elongation growth of roots by low concentrations of gibberellin. *Ann Bot.* 110(2), 373-381. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs049>
26. Van, S.N., Dinh, H., & Dzung, N.A. (2013). Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in green house. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(4), 289-294. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.06.001>