



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Desarrollo y caracterización de nanopartículas de quitosán con
micronutrientes benéficos de Ni, Co y Mo para su aplicación
agrobiotecnológica en plántulas de melón

TESIS

Para obtener el Título de:

Licenciado en Ingeniería en Biotecnología

Que presenta:

Isaac Lázaro Redonda

TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO, 202



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Institute of Agricultural Sciences

Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo., a 4 de julio de 2025
Numero de Control: IBT-004-2025
Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado al pasante de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, **Isaac Lázaro Redonda**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado **“Desarrollo y caracterización de nanopartículas de quitosán con micronutrientes benéficos de Ni, Co y Mo para su aplicación agrobiotecnológica en plántulas de melón”**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

PRESIDENTE	Dra. Hortensia Ortega Ortiz
SECRETARIO	Dr. Oscar Arce Cervantes
VOCAL 1	Dra. Silvia Armenta Jaime
SUPLENTE 1	Dra. Gabriela Yolotzin Romero Zúñiga

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Paul Misael Garza López Coordinador del Ingeniería en Biotecnología	Dr. Armando Peláez Acero Director del Instituto de Ciencias Agropecuarias



Avenida Universidad #133, Col. San Miguel
Huatengo. C.P. 43775. Santiago Tulantepec de
Lugo Guerrero, Hidalgo. México.
Teléfono: 7717172000 Ext. 42000
pelaeza@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Hidalgo (UAEH)**, así como al **Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp)**, por mi formación académica.

Al **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)** y al laboratorio de Materiales Avanzados por la oportunidad para realizar este proyecto.

A la **SECIHTI** por su apoyo económico a través de la beca recibida del proyecto A1-S-20923.

A la **Dra. Hortensia Ortega Ortiz** por la oportunidad de poder ingresar al CIQA, por el apoyo, orientación y paciencia durante mi estancia.

A la **Dra. Silvia Armenta Jaime** por brindarme el apoyo y acompañamiento durante este proceso.

A la **Dra. Gabriela Yolotzín Romero Zúñiga** por la constante asesoría y las revisiones para llevar a cabo este proyecto.

A la **Dra. Lluvia de Abril Alexandra Soriano Melgar** por su apoyo e instrucción en la cultivo y recolección de muestras.

A la **LCQ. Julieta Sánchez Salazar** por su apoyo y capacitación para el análisis FTIR-ATR.

A la **M.C. Bertha Alicia Puente Urbina** por su apoyo y capacitación en el equipo de XRD.

A la **M.C. Beatriz Reyes Vielma** por su asesoría en el equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Zeta.

Al **Dra. Yolanda Ortega Ortega** por su apoyo en la evaluación de propiedades bioquímicas de las muestras.

Al **Lic. Jesús Alejandro Espinosa Muñoz** por su apoyo en la determinación de los microelementos.

Al **Dr. José Alejandro Díaz Elizondo** por la preparación de la solución de quitosán en la Planta Piloto 2 del CIQA.

DEDICATORIA

A mis padres, por apoyarme y respaldar cada una de mis decisiones y proyectos. Gracias por el amor incondicional que siempre me brindan, por su paciencia, su ejemplo y por ser mi base en cada paso.

A mis hermanas, por acompañarme, por preocuparse por mí y estar presentes con cariño y apoyo constante.

A mis amigos, por estar al pendiente de mí, por escucharme y animarme cuando perdí los ánimos de continuar. Por siempre creer en mí.

Y a todos los profesores y asesores que me guiaron, gracias por compartir sus conocimientos con paciencia, entusiasmo y dedicación. Por motivarme, por confiar en mí y por ayudarme a expandir mi visión académica y profesional.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	14
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Quitosán: Propiedades y aplicaciones.....	2
2.2 Nanopartículas de quitosán (NPsCS).....	3
2.2.1 Métodos de síntesis para la obtención de nanopartículas de quitosán (NPsCS)	3
2.3 Aplicaciones y ventajas del uso de NPsCS en diferentes áreas	5
2.3.1 Aplicaciones de las NPsCS en la agrobiotecnología.....	5
2.3.2 Nanopartículas de quitosán como vehículo de micronutrientes	6
2.4 Micronutrientes benéficos para las plantas	7
2.4.1 Función del níquel en las plantas	8
2.4.2 Función del cobalto en las plantas.....	9
2.4.3 Función del molibdeno en las plantas	10
2.5 Síntesis de nanocompuestos de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)	10
2.5.1 Nanopartículas de quitosán con níquel (NPsCS-Ni)	10
2.5.2 Nanopartículas de quitosán con cobalto (NPsCS-Co)	11
2.5.3 Nanopartículas de quitosán con molibdeno (NPsCS-Mo)	12
2.6 Importancia agrícola y demanda comercial del melón variedad Cantaloupe	12
2.6.1 Plántulas de melón variedad Cantaloupe como modelo de estudio en agrobiotecnología: Aplicación de nanopartículas de quitosán	¡Error! Marcador no definido.
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS	17
V. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos	18
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	19

6.1 Materiales y equipos	19
6.2 Reactivos.....	19
6.2.1 Reactivos para la síntesis y caracterización de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi).....	19
6.3 Metodología	20
6.3.1 Preparación de las soluciones para la síntesis de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi).....	20
6.3.2 Síntesis de nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi).....	21
6.3.3 Preparación de soluciones de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) para su aplicación en semillas y plántulas de melón.....	23
6.3.4 Aplicación de nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) en semillas de melón	23
6.3.5 Aplicación de nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) en plántulas de melón.....	27
6.3.6 Preparación de soluciones para la evaluación del efecto de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) en semillas y plántulas de melón	29
6.4 Caracterización de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)	23
6.4.1 Determinación del tamaño de las NPsCS por dispersión de luz dinámica (DLS)	23
6.4.2 Potencial Zeta de las NPsCS-Mi	24
6.4.3 Espectrometría de absorción atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)	24
6.4.4 Espectroscopia infrarrojo por transformadas de Fourier acoplado a reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	24
6.4.5 Análisis termogravimétrico (TGA)	25
6.4.6 Calorimetría diferencial de barrido diferencial (DCS).....	25
6.4.7 Difracción de Rayos X (XRD)	25
6.5 Evaluación de las NPsCS y las nanopartículas de quitosán con micronutrientes en plántulas de melón	¡Error! Marcador no definido.
6.5.1 Efecto de la aplicación de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) sobre las propiedades morfológicas de las plántulas de melón.....	28
6.5.2 Efecto de la aplicación de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) sobre las propiedades bioquímicas de las plántulas de melón	29
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1 Caracterización de nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi).....	32
7.1.1 Determinación del rendimiento de las NPsCS-Mi, potencial Z y tamaño de partículas.	32

7.1.2 Determinación de microelementos por espectrometría de absorción atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).....	34
7.1.3 Espectroscopia infrarrojo por transformadas de Fourier acoplado a reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).....	35
7.1.4 Análisis termogravimétrico (TGA)	37
7.1.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	40
7.1.6 Difracción de rayos X (DRX)	43
7.2 Evaluación de las NPsCS y los complejos con microelementos (NPsCS-Mi) en plántulas de melón.....	¡Error! Marcador no definido.
7.2.1 Efecto de la aplicación de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) sobre las propiedades morfológicas de las plántulas de melón.....	46
7.3.2 Efecto de la aplicación de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) sobre las propiedades bioquímicas de las plántulas de melón	54
CONCLUSIONES	65
TRABAJO A FUTURO	66
REFERENCIAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

CS	Quitosán
NPsCS	Nanopartículas de quitosán
NPsCS-Ni	Nanopartículas de quitosán con níquel
NPsCS-Co	Nanopartículas de quitosán con cobalto
NpPsCS-Mo	Nanopartículas de quitosán con molibdeno
NPsCS-Trip	Nanopartículas de quitosán con níquel, cobalto y molibdeno
NPsCS-Mi	Nanopartículas de quitosán cargadas con micronutrientes
AOT	Sulfosuccinato sódico
DEX-DXR	dextrano-doxorrubicinabis-(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico
MA	metionina aminopeptidasa
ACC	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa
TPP	Tripolifosfato de sodio
PPO	Oxido de propileno
NPs	Nanopartículas
ppm	Partes por millón
NR	Nitrato reductasa
ABA	Ácido abscísico
IAA	Ácido indol-3-acético
AO	Aldehído oxidasa
SO	Sulfito oxidasa
Moco	Cofactor de molibdeno
SULTr	Transportadores de sulfato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
DPPH	2, 2, difenil-1-picrilhidracilo
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Estructura de la quitina y del quitosán.....	2
Esquema 2. Síntesis de nanopartículas de quitosán por el método de gelación iónica.	22
Esquema 3. Sistemas de cultivo <i>i)</i> cultivo en caja, <i>ii)</i> cultivo en taco y <i>iii)</i> cultivo en sustrato	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de infrarrojo del quitosán (a), NPsCS (b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Co (d), NPsCS-Mo (e) y NPsCS-Ni, Co, Mo (f).	36
Figura 2. Termogramas de quitosán (a), nanopartículas de quitosán (b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Co (d), NPsCS-Mo (e) y NPsCS-Trip (f).	39
Figura 3. Termogramas amplificado de Quitosán (a), Nanopartículas de quitosán (b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Co (d), NPsCS-Mo (e) y NPsCS-Trip (f).	40
Figura 4. Termogramas de Quitosán (a), Nanopartículas de quitosán (b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Co (d), NPsCS-Mo(e)y NPsCS-Trip(f) por Calorimetría diferencial de barrido	42
Figura 5. Difractograma de quitosán (a), nanopartículas de quitosán (b)	45
Figura 6. Difractograma de Nanopartículas de quitosán (a), NPsCS-Co b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Mo (d) y NPsCS-Trip (e).....	46
Figura 7. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre el porcentaje de germinación de semillas de melón variedad Cantaloupe.	48
Figura 8. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre el crecimiento radicular y aéreo en plántulas de melón	51
Figura 9. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre la cantidad de clorofilas A y B en plántulas de melón variedad Sunrise.....	56
Figura 10. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre el contenido de fenoles totales en tallos plántulas de melón variedad Cantaloupe.	58
Figura 11. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre la capacidad antioxidante de tallos plántulas de melón aspersión.	60
Figura 12. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre el contenido de proteínas totales en tallos plántulas de melón (Cantaloupe).	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento, tamaño de partícula y potencial Z de las NPsCS y de los complejos de NPsCS-Ni, NPsCS-Co y NPsCS-Mo; así como de las NPsCS-Trip.....	32
Tabla 2. Determinación del contenido de micronutrientes (Ni, Co y Mo) por espectrometría de absorción atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).....	34
Tabla 3. Termogramas DSC de temperatura máxima y entalpia de degradación de quitosán, Nanopartículas de quitosán y NPsCS-Mi	43
Tabla 4. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi en la formación de biomasa en plántulas de melón variedad Cantaloupe.	53

RESUMEN

En la presente tesis de licenciatura se sintetizaron nanopartículas de quitosán (NPsCS) mediante el método de gelación iónica, en su forma pura e incorporando micronutrientes esenciales como: níquel (30 ppm), cobalto (20 ppm) y molibdeno (3 ppm), con el propósito de evaluar su aplicación en semillas y plántulas de melón de la variedad *Cantaloupe*.

Tanto las nanopartículas puras como las que contenían micronutrientes (NPsCS-Mi) fueron caracterizadas mediante FTIR-ATR, TGA, DSC, DRX, DLS, potencial Zeta e ICP-OES. Las nanopartículas presentaron tamaños de partícula entre 265 y 530 nm, con un potencial Zeta superior a 28.4 mV, lo que indicó su buena estabilidad coloidal. Se identificaron grupos funcionales polares (amina e hidroxilo) y su interacción con el tripolifosfato de sodio, así como la presencia de los micronutrientes en estudio (Ni, Co y Mo). Las NPsCS-Mi mostraron una mayor estabilidad térmica, así como modificaciones en su morfología y cristalinidad en comparación con las NPsCS puras.

Las NPsCS y los nanocompuestos de NPsCS-Mi se aplicaron en semillas de melón en tres métodos de germinación: taco, caja Petri y sustrato, y mediante aplicación foliar (aspersión) en plántulas. Se evaluaron la germinación y el desarrollo de las plántulas (elongación y biomasa), así como las propiedades bioquímicas asociadas al metabolismo primario y secundario: clorofilas, proteínas, fenoles totales y capacidad antioxidante. La aplicación de las NPsCS-Ni presentaron un mayor efecto sobre el tiempo de germinación, el crecimiento de las raíces y la tolerancia al estrés. Los resultados de la evaluación de las propiedades bioquímicas indicaron que las NPsCS-Mi pueden actuar como bioestimulantes de la germinación, desarrollo y tolerancia al estrés en plántulas de melón, pero su efectividad depende del tipo del sistema de germinación, la concentración y las condiciones ambientales.

Los nanocompuestos estudiados son materiales amigables con el medio ambiente y potencialmente pueden reemplazar y competir con los fertilizantes comerciales que contaminan suelo y agua. Además, podrían tener aplicaciones médicas, antimicrobianas, anticancerígenas y antioxidantes.

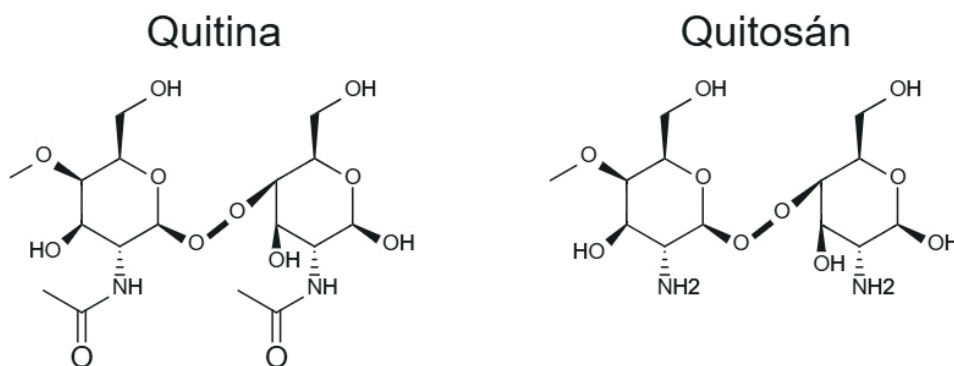
Palabras clave: Nanopartículas de quitosán, gelación ionica, micronutrientes (Ni, Co, Mo), *Cucumis melo*

I. ANTECEDENTES

2.1 Quitosán: Propiedades y aplicaciones

El quitosán es un biopolímero derivado de la desacetilación termoalcalina de la quitina (Esquema 1). Su estructura lineal consiste en unidades de 1, 4- β -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, y cuenta con una naturaleza ligeramente hidrofílica (Raza et al., 2020). Presenta variaciones estructurales que dependen de su grado de desacetilación, peso molecular, fuente y método de extracción, lo que afecta directamente sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad y viscosidad) y biológicas (actividad antimicrobiana y biocompatibilidad).

El quitosán es un biopolímero que destaca por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, biodegradables, biocompatibles, osteoconductoras y no antigénicas, así como por su capacidad para formar biopelículas, matrices extracelulares y complejos electrolíticos (Guo et al., 2024). Sin embargo, su baja solubilidad en agua y en pH fisiológico, junto con propiedades mecánicas débiles, limitan algunas de sus aplicaciones (Raza et al., 2020). Gracias a su baja toxicidad, el quitosán ha sido estudiado en áreas como la agricultura, la medicina, la tecnología de alimentos y la farmacéutica (Wang et al., 2024).



Esquema 1. Estructura de la quitina y del quitosán

Desde 1979 se ha documentado su actividad antimicrobiana, la cual se basa en la interacción de sus grupos funcionales con las paredes celulares de los patógenos, lo que provoca la ruptura de las membranas y, como resultado, la muerte celular. Además, los grupos amino pueden reaccionar con radicales libres, mitigando el daño oxidativo celular. La capacidad antioxidante del quitosán está fuertemente ligada a su peso molecular, ya que un menor peso molecular

mejora la disponibilidad de los grupos amino y, por ende, su eficacia (J. Wang et al., 2024). En la agricultura, el quitosán se utiliza como acarreador de nutrientes debido a su capacidad de quelar metales, y se ha evaluado como aditivo en fertilizantes para liberar y absorber nutrientes de manera controlada (Deshpande et al., 2017; Parthasarathy et al., 2023), también se ha utilizado en diferentes estudios como promotor de germinación y crecimiento en semillas, como una nueva alternativa a los inductores químicos que contrarrestan los efectos del estrés abiótico causado por el cambio climático (Riseh et al., 2024).

2.2 Nanopartículas de quitosán (NPsCS)

2.2.1 Métodos de síntesis para la obtención de nanopartículas de quitosán (NPsCS)

El quitosán tiene la capacidad de formar geles al interactuar con aniones. Esta propiedad fue inicialmente estudiada para la liberación de fármacos, pero su aplicación estuvo limitada debido al tamaño de las partículas obtenidas (1-2 mm). Las nanopartículas de quitosán (NPsCS) se describieron por primera vez en 1994 para la administración del fármaco anticancerígeno 5-fluorouracilo (Grenha, 2012). Desde entonces, se han desarrollado e innovado los procesos de síntesis de NPsCS (Divya & Jisha, 2018a). Hasta la fecha, se han explorado diversos métodos para la síntesis de nanopartículas de quitosán, con el objetivo de desarrollar formulaciones adecuadas que se ajusten a las necesidades específicas, a través de diseños personalizados de moléculas. Los métodos de síntesis de nueva generación implican procedimientos menos complejos, utilizan menos disolventes orgánicos (Jha & Mayanovic, 2023a), mejoran la rentabilidad y la velocidad de reacción (Karamchandani et al., 2024). A continuación, se describen los métodos más utilizados para la síntesis de NPsCS:

Gelificación iónica. Este método fue introducido por Calvo y colaboradores (1997) como una alternativa para la síntesis de NPsCS, permitiendo el diseño de nanopartículas capaces de integrar proteínas y péptidos. Utiliza un polianión, como el tripolifosfato de sodio (TPP), que interactúa iónicamente con los grupos amino del quitosán (CS), reduciendo el tamaño de las partículas a escala nanométrica (Jha & Mayanovic, 2023). En este primer estudio, se determinaron los rangos "óptimos" de concentración de CS, TPP y óxido de propileno (PPO). El proceso es sencillo: el quitosán se disuelve en una solución ligeramente ácida (generalmente ácido acético) y se puede añadir un agente estabilizante. Luego, se agrega el polianión (TPP) bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante un tiempo relativamente corto (Jha &

Mayanovic, 2023). Este método se basa en interacciones de reticulación entre los grupos funcionales del CS (amino protonados, NH_3^+) y los grupos fosfato del TPP (carga negativa) (Sacco et al., 2021), disminuyendo el tamaño de las partículas (200-1000 nm). Es útil para generar NPs compatibles con compuestos bioactivos, ampliando su aplicación biológica y reduciendo toxicidad. Sin embargo, puede disminuir la estabilidad dependiendo del complejo que acompañe a las NPs (Sacco *et al.*, 2021) (Chandra Hembram *et al.*, 2016; Divya & Jisha, 2018).

Complejo polielectrolítico. Este método se basa en la interacción iónica entre un contranión o molécula cargada negativamente y el quitosán, que actúa como catión. La neutralización de cargas forma un complejo autoensamblado, reduciendo la hidrofiliidad (Jha & Mayanovic, 2023b). Este método permite obtener partículas de entre 50 y 800 nm (Chandra Hembram et al., 2016). Factores clave como el pH y el peso molecular del quitosán afectan el diseño de tamaño y rendimiento. Un pH bajo y un peso molecular moderado favorecen la complejación de las NPs (Chandra Hembram et al., 2016; Divya & Jisha, 2018). Aunque permite integrar moléculas bioactivas, este método requiere que los compuestos tengan una carga compatible para interactuar.

Microemulsión o Micelización inversa. Este método permite la generación de casi cualquier tipo de NPs mediante emulsiones, en donde líquidos inmiscibles interactúan con surfactantes y agentes entrecruzantes (Caro-León *et al.*, 2019). En el caso de las NPsCS, se genera una microemulsión de micelas inversas en una fase dispersante (generalmente hexano), equilibrada con surfactantes como bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (AOT). La adición de un agente entrecruzante mejora las interacciones entre el CS y otros compuestos. Por ejemplo, (Mitra et al., 2001) sintetizaron NPsCS utilizando hexano y evaluaron su actividad antitumoral, AOT y un conjugado de dextrano-doxorrubicina (DEX-DXR), obteniendo partículas de 100 nm. Este método también permite manipular el tamaño de las NPs según el grado de desacetilación y la cantidad de surfactante. Sin embargo, el uso de solventes orgánicos y surfactantes con potencial toxicidad ha reducido su interés en investigaciones actuales (Caro-León *et al.*, 2019) (Jha & Mayanovic, 2023)

Desolvatación. Basado en interacciones físicas, este método implica la precipitación del quitosán mediante la adición de un agente precipitante (como sulfato de sodio) que compite por solvatar el agua, reduciendo la solubilidad del CS y favoreciendo la formación de NPs (Bhatt et

al., 2024). Inicialmente este método fue utilizado para elaborar microportadores de complejos bioactivos y ahora es empleado para obtener NPsCS con aplicaciones terapéuticas (Jha & Mayanovic, 2023).

Difusión de disolventes. Este método es útil para cargar compuestos insolubles en agua, como ciclosporina-A o levofloxacin (Caro-León et al., 2019). Utiliza una fase orgánica (cloruro de metilo y acetona) y una solución acuosa de quitosán estabilizada con agentes emulsificantes, como lecitina y poloxámero 188. El solvente se elimina mediante rotaevaporación, permitiendo que los complejos de quitosán y el fármaco precipiten como NPs.

2.3 Aplicaciones y ventajas del uso de NPsCS en diferentes áreas

2.3.1 Aplicaciones de las NPsCS en la agrobiotecnología

Se reporta que, la aplicación de NPsCS en semillas promueve una retención y liberación controlada de agua debido a su capacidad higroscópica, controlando así la hidratación e inicio de rutas metabólicas en la semilla (Guan et al., 2009; Szymańska & Winnicka, 2015a). Además, las NPsCS son capaces de inducir la expresión de genes que señalizan la interrupción de síntesis de ABA, el cual se relaciona al estado de dormancia de las semillas (Farooq et al., 2022). Asimismo, algunos autores han planteado que las NPsCS incrementan la germinación en algunos cultivos ya que estimulan enzimas del metabolismo secundario tales como la quitinasa, celulasa y β -1,3 glucanasa (Choudhary et al., 2017). Sin embargo, una alta concentración de NPsCS aplicadas puede tener efectos adversos, generando efectos tóxicos y altos niveles de estrés lo que reduce significativamente la germinación, desarrollo y rendimiento de la planta (Allam et al., 2024; Choudhary et al., 2017)

Aunque su principal aplicación es como fertilizante y agente antimicrobiano, las NPsCS también tienen un gran potencial como reguladores del crecimiento vegetal. Gracias a su capacidad de transporte, pueden cargarse con hormonas o elicitores que favorecen las respuestas fisiológicas de las plantas. Además, los nuevos fertilizantes y pesticidas buscan optimizar la producción agrícola reduciendo su impacto en el suelo. Esto se logra mediante formulaciones dirigidas y controladas que encapsulan nutrientes o compuestos para ser liberados lentamente bajo condiciones específicas. En el ámbito agrícola, las NPsCS también son útiles para acondicionar suelos, ya que pueden transportar materia orgánica y microorganismos benéficos. Esto

contribuye a mejorar la estructura del suelo y su capacidad de retención hídrica (Karamchandani *et al.*, 2024).

La agricultura moderna enfrenta una serie de desafíos impuestos por el cambio climático, como la sequía y las altas temperaturas, así como problemas de origen antropogénico, como la contaminación del suelo y el agua, y la infertilidad causada por el uso excesivo. Por esta razón, el desarrollo de nuevos fertilizantes y agroquímicos se ha orientado hacia alternativas más sustentables y sostenibles.

En este contexto, las nanopartículas de quitosán (NPsCS) han sido objeto de estudio por sus múltiples propiedades y aplicaciones. Su uso ha sido analizado tanto de forma aislada como en combinación con metales como Níquel (Ni), Selenio (Se), Cobalto (Co), Silicio (Si), Zinc (Zn), Plata (Ag), entre otros (Biao *et al.*, 2017; Chouhan *et al.*, 2022; Senthilkumar *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020; Vanti *et al.*, 2020).

Los fertilizantes basados en NPsCS forman parte de una nueva generación de fertilizantes inteligentes que prometen una liberación y absorción de nutrientes más lenta y controlada, reduciendo el impacto ambiental asociado con el uso excesivo de fertilizantes convencionales (Kumaraswamy *et al.*, 2021). Estas nanopartículas tienen la capacidad de quelatar diversos metales y liberarlos de manera gradual, lo que mejora la eficacia y la absorción de fertilizantes y pesticidas.

Se ha demostrado que la aplicación de NPsCS, junto con ciertos oligonutrientes, mejora las características de los cultivos y su tolerancia a diversos tipos de estrés (Riseh *et al.*, 2024; Sheikhalipour *et al.*, 2021). Estas nanopartículas han sido empleadas como fuente de carbono (54.4–47.9 %), oxígeno (42.3–30.19 %), nitrógeno (7.6–5.8 %) y fósforo (6.1–3.4 %) para distintos cultivos (Choudhary *et al.*, 2017; Kumaraswamy *et al.*, 2019, 2021).

2.3.2 Nanopartículas de quitosán como vehículo de micronutrientes

Los recientes avances en biotecnología han impulsado el desarrollo y la evolución de los sistemas agrícolas mediante la implementación de nanoformulaciones, como nanofertilizantes, pesticidas, herbicidas y sensores, que mejoran la calidad y la salud de los suelos y cultivos. En este contexto, los nanocompuestos tienen el potencial de corregir deficiencias de micronutrientes en cultivos de interés agrícola. Gracias a su capacidad de liberación controlada,

es posible suministrar nutrientes en dosis y tiempos específicos (Hidangmayum & Dwivedi, 2022).

La estructura del quitosán es particularmente adecuada para la unión de iones metálicos mediante intercambio iónico, formación de complejos, sorción física y atrapamiento intermolecular e intramolecular. Las formulaciones basadas en NPsCS permiten una liberación controlada y una estabilidad superior para los compuestos encapsulados (Hidangmayum & Dwivedi, 2022). Para lograr las propiedades deseadas, es fundamental considerar las características del quitosán, el compuesto a encapsular y el método de formulación utilizado (Karamchandani et al., 2022). Los nanofertilizantes presentan la ventaja de su tamaño reducido, lo que mejora su permeabilidad a través de las paredes celulares de la planta, permitiendo una absorción rápida y eficiente de los nutrientes. Además, su capacidad para dirigirse a elementos específicos optimiza su uso (Datta et al., 2024; Karamchandani et al., 2024). Estos fertilizantes ofrecen una buena relación costo-beneficio, ya que mejoran significativamente las condiciones del suelo y los cultivos, además de interactuar con la microbiota del suelo y sus componentes (Saravana kumari et al., 2024).

En la última década, se han reportado estudios sobre la actividad combinada de las NPsCS con diferentes micronutrientes. Por ejemplo, la aplicación de NPsCS con cobre (Cu) en cultivos de maíz (*Zea mays* L.) ha demostrado actuar como catalizador del crecimiento y aumentar la resistencia a la podredumbre del tallo en la etapa post-floración (Sharma et al., 2024). De manera similar, se ha reportado que el uso de NPsCS con cobre en cultivos de tomate mejora el crecimiento, el rendimiento y las características nutricionales del fruto (Ortega-Ortíz et al., 2016). Por otro lado, Deshpande *et al.* (2017) sugieren la aplicación foliar de zinc utilizando como acarreador NPsCS, con el objetivo de fortificar y nutrir cultivos con deficiencia de este mineral. Otros estudios han utilizado NPsCS en combinación con selenio (Se) para potenciar la resistencia al estrés salino en cultivos de melón agrio (Sheikhalipour *et al.*, 2021) y como agente antioxidante (Luo et al., 2010; Zhai et al., 2017).

2.4 Micronutrientes benéficos para las plantas

Un elemento benéfico es aquel que, aunque no es esencial para todas las especies de plantas, en concentraciones bajas puede mejorar el crecimiento, la productividad o la salud de los cultivos. Sin embargo, en dosis elevadas, puede resultar tóxico, afectando negativamente el

desarrollo de la planta. Estos elementos desempeñan funciones importantes en el metabolismo y en diversos procesos fisiológicos, pero su presencia debe estar cuidadosamente regulada para evitar efectos adversos (Pilon-Smits et al., 2009; Trejo-Téllez & Gómez-Merino, 2023).

Se ha reportado que la aplicación de micronutrientes, genera diferentes respuestas sobre la germinación dependiendo de la concentración, tipo de cultivo y condiciones exógenas (Allam et al., 2024).

2.4.1 Función del níquel en las plantas

El níquel (Ni) es el 22º elemento más abundante en la Tierra y está presente en los suelos en concentraciones traza (Ahmad et al., 2009). Aunque se ha considerado un metal pesado contaminante de suelos también es reconocido como el 17º microelemento esencial para el desarrollo de algunas plantas superiores (Hassan et al., 2019). Su función principal es actuar como cofactor de la enzima ureasa, la cual transforma la urea en amonio dentro del ciclo del nitrógeno en las plantas. Además, su importancia se asocia con el funcionamiento de otras enzimas, por lo que su deficiencia puede provocar intoxicaciones por acumulación de urea, causando necrosis celular, reducción del tamaño de las hojas y afectaciones en las estructuras radiculares (Fabiano et al., 2015; Rabinovich et al., 2024). El níquel también es un componente de otras metaloenzimas, como la superóxido dismutasa, la metil coenzima M reductasa y la acetil coenzima A sintetasa, entre otras. Su deficiencia puede reducir la actividad enzimática (Patra et al., 2020). La absorción de Ni en las plantas ocurre a través del sistema radicular mediante difusión pasiva y transporte activo (Kastori et al., 2022). Cabe mencionar que, al ser un elemento benéfico, pero no esencial, puede generar efectos adversos cuando sus concentraciones superan los niveles recomendados.

El efecto del níquel en plantas varía según el cultivo, se ha reportado que su aplicación mejora el rendimiento, el crecimiento y el índice de germinación, además de aumentar la concentración total de clorofila (Patra et al., 2020). Roach y Barclay (1946) fueron los primeros en investigar la importancia y el efecto de este metal en cultivos de trigo, concluyendo que la aplicación de 100 ppm favorecía la elongación de tallos y raíces, además de incrementar la concentración de clorofila. De manera similar, su aplicación en semillas de maíz mejoró el índice de germinación e influyó positivamente en la asimilación de nitrógeno para el desarrollo de la planta (Mishra & Kar, 1974; Welch, 1981).

2.4.2 Función del cobalto en las plantas

El cobalto (Co) es un metal de transición (número atómico 27, peso atómico 58.9332 u) sólido a temperatura ambiente y considerado esencial en organismos procariotas, humanos y algunos mamíferos. Aunque no es clasificado como nutriente esencial para plantas, se reconoce como un elemento beneficioso para su desarrollo (Pilon-Smits *et al.*, 2009). Está presente naturalmente en el ambiente y participa en diversas enzimas y coenzimas (Marschner, 1995), siendo especialmente relevante en la fijación biológica del nitrógeno en leguminosas (HEWITT & BOND, 1966).

La concentración de Co en suelos varía entre 15–25 ppm, en aguas naturales cerca de 0.04 ppm, y en plantas entre 0.1–10 ppm en peso seco. En exceso, puede causar daños celulares, inhibir la absorción de agua y nutrientes, generar clorosis, reducir biomasa y bloquear la biosíntesis de clorofila (Li *et al.*, 2009; Mysliwa-Kurdziel *et al.*, 2004).

El Co también regula la transpiración y es parte de enzimas involucradas en el transporte de nitrógeno (Elshamly & Nassar, 2023). Aunque no se ha documentado su deficiencia en plantas, su presencia puede mejorar el crecimiento. Tiene un efecto antagónico sobre la producción de etileno al inhibir la enzima ACC oxidasa (Lau & Yang, 1976; Serek *et al.*, 2006). Además, actúa como cofactor en múltiples metaloenzimas en organismos no vegetales, aunque su papel exacto en plantas aún no se ha esclarecido (Falcón *et al.*, 2010). Se cree que su transporte ocurre vía xilema a través de transportadores de hierro y puede sustituir a otros metales como Fe, Cu o Zn en ciertas enzimas (Hu *et al.*, 2021; PAGE & FELLER, 2005).

La aplicación de Co a bajas concentraciones puede mejorar la germinación, mientras que a concentraciones altas (>40 ppm) puede inhibir la replicación celular y causar daño cromático, además de reducir el potencial hídrico, dependiendo del cultivo (Akeel & Jahan, 2020). También a bajas concentraciones ha demostrado efectos positivos en varios cultivos como en el cacahuate, mejora altura, número de nudos, tamaño foliar y contenido de aceites y proteínas (Elshamly & Nassar, 2024); en soya, incrementa la absorción de N y el desarrollo foliar y radicular (Kandil *et al.*, 2013); en pepino, promueve la elongación del hipocótilo; y en maíz, aumenta la tasa fotosintética y el número de cloroplastos (Cheruth *et al.*, 2009)

2.4.3 Función del molibdeno en las plantas

El molibdeno (Mo) es un micronutriente esencial para plantas y animales, presente como traza en la mayoría de los suelos. En suelos agrícolas, su forma más común es el anión molibdato (MoO_4^{2-}), siendo su solubilidad altamente dependiente del pH: es mayor en suelos alcalinos y disminuye en suelos ácidos (Kaiser *et al.*, 2005). A pesar de ello, la absorción de Mo por las plantas no siempre sigue esta relación directamente, ya que también influye la química del suelo. El Mo actúa como cofactor en varias enzimas clave, especialmente aquellas involucradas en la asimilación del nitrógeno, como la nitrato reductasa y la nitrogenasa (Williams & Frausto da Silva, 2002; Mendel & Hänsch, 2002). También interviene en procesos metabólicos como el catabolismo de purinas (XDH), la síntesis de fitohormonas como ABA e IAA (a través del aldehído oxidasa), y el metabolismo del azufre (SO). Su deficiencia afecta la producción del cofactor de molibdeno (Moco), lo que provoca síntomas similares a la deficiencia de nitrógeno, necrosis foliar y alteraciones en el crecimiento vegetal debido a la desregulación hormonal y estomática.

El transporte de Mo en las plantas ocurre principalmente en forma de molibdato a través del xilema, mediado por transportadores específicos de aniones y algunos transportadores de sulfato (Huang *et al.*, 2022; Weber *et al.*, 2024). En ciertas especies, también puede redistribuirse vía floema (Hale *et al.*, 2001). En leguminosas, el Mo es indispensable para la actividad de la nitrogenasa en los nódulos, facilitando la fijación biológica del nitrógeno (Kaiser *et al.*, 2005; Mendel & Hänsch, 2002).

2.5 Síntesis de nanocompuestos de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

2.5.1 Nanopartículas de quitosán con níquel (NPsCS-Ni)

El níquel (Ni) es un elemento benéfico para el desarrollo de diversos cultivos, ya que mejora el rendimiento, la germinación, el tamaño de las plantas y sus propiedades bioquímicas. En los últimos años, el desarrollo de nanopartículas de quitosán (NPsCS) con Ni ha sido reportado como una alternativa fungicida para el tratamiento de patógenos que afectan cultivos como el arroz y el trigo. Esto se debe a que las NPsCS con Ni han demostrado poseer actividad antimicrobiana, lo que las convierte en una opción prometedora para la protección de cultivos (Divya & Jisha, 2018).

En los estudios realizados, las NPsCS con níquel fueron sintetizadas mediante el método de gelación iónica, utilizando quitosán de bajo peso molecular (50,000–190,000 Da; 80 % N-desacetilación). Como resultado, se obtuvieron nanopartículas esféricas con tamaños que variaron entre 90 y 124 nm, lo que dependió de la concentración de cloruro de níquel (NiCl_2) utilizada, que osciló entre 0.01 % y 4 % (p/v). Se ha confirmado que la formación del complejo NPsCS-Ni ocurre debido a la interacción electrostática entre los grupos hidroxilo del quitosán y los iones metálicos (Chouhan et al., 2022). En ambos casos, las NPsCS con Ni fueron aplicadas a las semillas, logrando inhibir la formación de micelios y esporas. Sin embargo, hasta el momento, la información disponible sobre su uso como fertilizante es escasa o nula, a pesar de que el níquel ya se encuentra integrado como nutriente en algunos fertilizantes comerciales. La aplicación de níquel en cultivos mediante NPsCS podría mejorar su absorción y liberación controlada, lo que reduciría su acumulación en el suelo y, en consecuencia, minimizaría su impacto ambiental. Esta estrategia podría representar una alternativa eficiente y sostenible para optimizar el uso de níquel en la agricultura.

2.5.2 Nanopartículas de quitosán con cobalto (NPsCS-Co)

El desarrollo de nanopartículas de quitosán con cobalto (NPsCS-Co) es aún limitado, y se requiere mayor investigación en esta área. Actualmente, la mayoría de los estudios sobre el uso de Co con quitosán se han centrado en su actividad antimicrobiana dentro de los composites (Gingas et al., 2018). La aplicación de NPsCS con Co se ha enfocado principalmente en su actividad biológica contra patógenos. Estudios recientes han reportado su efectividad como agente antimicrobiano (Bashal et al., 2023; Karthikeyan et al., 2022), sintetizándolas a partir de diferentes métodos que reducen la citotoxicidad del compuesto. Los resultados de estas investigaciones han demostrado que su aplicación es eficaz contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, además de no presentar toxicidad en cultivos celulares animales. Este estudio busca ampliar el conocimiento en esta área, explorando las NPsCS-Co como un vehículo inteligente para la aplicación de micronutrientes en cultivos. Considerando que el uso excesivo de fertilizantes degrada la calidad y propiedades del suelo, el aprovechamiento de las NPsCS-Co podría representar una estrategia más eficiente y sostenible. Además, se destaca la importancia del Co en el desarrollo de los cultivos, lo que refuerza la necesidad de investigar su potencial en aplicaciones agrícolas.

2.5.3 Nanopartículas de quitosán con molibdeno (NPsCS-Mo)

El quitosán ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas, capaces de inhibir el crecimiento de hongos y bacterias. Además, posee la capacidad de quelar diferentes metales, como es el caso del molibdeno (Mo), el cual, como se mencionó previamente, es fundamental en el funcionamiento de enzimas fijadoras de nitrógeno en las plantas. Asimismo, es un nutriente esencial para bacterias simbióticas asociadas a las raíces de leguminosas, facilitando la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, la investigación sobre nanopartículas de quitosán con molibdeno (NPsCS-Mo) ha estado mayormente enfocada en el área médica, con escasa exploración de su potencial en aplicaciones agrobiotecnológicas para cultivos agrícolas. Cao *et al.* (2019) reportaron que los nanocompuestos de quitosán y Mo poseen una alta actividad antimicrobiana, específicamente contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Este efecto se debe al daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por los nanocompuestos dentro de las células bacterianas. Para este estudio, se utilizó disulfuro de molibdeno (MoS_2) en combinación con quitosán de bajo peso molecular, empleando el método de tiol-ligando para su síntesis. Este método permite la formación de estructuras estables, aumentando la interacción entre el Mo y el quitosán, lo que podría mejorar su potencial aplicación en la agricultura como un sistema de liberación controlada de molibdeno en cultivos.

2.6 Importancia agrícola y demanda comercial del melón variedad Cantaloupe

El cultivo de melón en México es considerado de gran importancia debido a la derrama económica que genera y a su rol como fuente de trabajo año tras año. En 2023 se registró una producción total de 645 mil 002 toneladas del fruto, lo que requirió una superficie de 19 mil 501 hectáreas. La producción de melón en 2024 experimentó un crecimiento del 11.2 % respecto al año anterior, siendo Coahuila y Guerrero los principales productores a nivel nacional (SIAP, 2024). Cabe mencionar que parte de la producción de melón es exportada principalmente a Estados Unidos, con ventas que alcanzaron los 25 millones 698 mil dólares en 2022 (SIAP, 2023).

En comunidades rurales, el cultivo de melón genera empleo para la población local durante las temporadas de siembra y cosecha de diciembre a febrero, lo cual tiene un alto impacto social en lugares donde las opciones de empleo son limitadas (Burciaga, 2023). Esto impulsa el desarrollo

de infraestructuras locales como centros de trabajo y transporte, beneficiando a las comunidades en términos de desarrollo y acceso a recursos básicos (Galván, 2025).

En México se producen principalmente tres variedades de melón: Cantalupo, valenciano y el melón verde. El noreste del país es la región en donde mejor se ha adaptado a las condiciones climáticas, aunque su producción se extiende a lo largo de todo el territorio nacional. En 2023, se estimó que el consumo per cápita fue de 3.7 Kg, destacándose como un fruto de temporada muy popular y de alto valor nutrimental, con un 90 % de su peso en agua, y una gran cantidad de vitamina C y E (SDR,2024 & SIAP, 2024).

II. INTRODUCCIÓN

La industria de procesamiento de mariscos genera grandes volúmenes de residuos ricos en quitina, cuyo manejo inadecuado representa un problema ambiental y económico. No obstante, estos desechos pueden valorizarse mediante la extracción de quitina y su conversión en quitosán (CS), aportando valor agregado a la cadena productiva.

El quitosán es un polisacárido derivado de la quitina, biopolímero presente en los exoesqueletos de crustáceos, insectos y otros invertebrados. Gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para formar estructuras estables, ha sido ampliamente aplicado en áreas como la medicina, la industria alimentaria y la agricultura. Una de sus aplicaciones más prometedoras es la síntesis de nanopartículas de quitosán (NPsCS), las cuales pueden coordinarse con micronutrientes esenciales y emplearse como biofertilizantes de liberación controlada.

En agricultura, el uso de NPsCS coordinadas con micronutrientes como níquel (Ni), cobalto (Co) y molibdeno (Mo) representa una alternativa innovadora para mejorar la nutrición vegetal. Estos elementos, requeridos en pequeñas cantidades, son fundamentales para el desarrollo de las plantas, facilitando la absorción de nutrientes, el crecimiento y la tolerancia al estrés. Su aplicación controlada mediante nanopartículas permite una liberación dirigida, reduciendo el riesgo de acumulación en el suelo y minimizando el impacto ambiental.

El melón (*Cucumis melo*) es un cultivo de gran importancia en México, tanto por su valor económico como por su aporte a la seguridad alimentaria. Su nutrición adecuada es clave para mejorar el rendimiento y la calidad del fruto. En este contexto, el uso de NPsCS-Mi (nanopartículas de quitosán con micronutrientes) podría optimizar la fertilización del cultivo, incrementando la eficiencia en el uso de nutrientes y reduciendo la dependencia de fertilizantes convencionales.

En este contexto, en la presente tesis se propuso la síntesis y aplicación de complejos de nanopartículas de quitosán coordinadas con micronutrientes (NPsCS-Mi) que incorporan níquel, cobalto y molibdeno, con el objetivo de evaluar su efecto en semillas y plántulas de melón de la variedad Cantaloupe se propone como una estrategia innovadora para mejorar su crecimiento y desarrollo. Estos micronutrientes son fundamentales para procesos metabólicos clave en las plantas, como la fijación de nitrógeno y la activación de enzimas involucradas en la fotosíntesis. Al combinarse con nanopartículas de quitosán, un biopolímero natural con propiedades

antimicrobianas y capacidad de liberación controlada, se facilita una absorción más eficiente de los nutrientes, promoviendo un desarrollo más vigoroso de las plántulas. Esta aplicación en agrobiotecnología no solo optimiza el uso de nutrientes, sino que también ofrece una alternativa sostenible a los fertilizantes tradicionales, reduciendo su impacto ambiental.

III. JUSTIFICACIÓN

Las propiedades de las nanopartículas de quitosán (NPsCS) como agentes quelantes y transportadores permiten que este material actúe como un vehículo eficiente de micronutrientes en aplicaciones agrobiotecnológicas, optimizando y controlando su liberación hacia cultivos de interés. La entrega de micronutrientes puede ser controlada a través de un sistema diseñado para garantizar una aplicación óptima y compatible con las necesidades de los cultivos. De este modo, el diseño de NPsCS coordinadas con micronutrientes puede mejorar su entrega y liberación, potenciando los beneficios sobre semillas y plántulas de melón en la región de Saltillo, Coahuila.

IV. HIPÓTESIS

El uso de nanopartículas de quitosán como matriz polimérica facilitará la liberación controlada y gradual de los micronutrientes de Ni, Co y Mo, asegurando su disponibilidad en una concentración óptima para su absorción por las plántulas de melón. Este sistema no solo mejorará la eficiencia en el uso de micronutrientes, sino que también contribuirá a la reducción del uso de fertilizantes químicos convencionales, favoreciendo un desarrollo más saludable de las plantas.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Sintetizar y evaluar el efecto de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes benéficos de Ni, Co y Mo como biofertilizantes en plántulas de melón.

5.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) de níquel (NPsCS-Ni) cobalto (NPsCS-Co) y molibdeno (NPsCS-Mo) de manera *in-situ*.
- Sintetizar nanopartículas de quitosán con los tres micronutrientes de Ni, Co y Mo (NPsCS-Ni, Co, Mo) *in-situ*.
- Caracterizar las propiedades químicas, térmicas y morfológicas de las nanopartículas de quitosán con los micronutrientes de Ni, Co y Mo.
- Evaluar el efecto de las NPsCS-Mi en semillas de melón y sobre las propiedades bioquímicas de plántulas de melón.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Materiales y equipos

- Material de vidrio diverso
- Micropipetas
- Parrilla de agitación
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Centrifuga marca Thermo Scientific, modelo SORVALL RC-6
- Procesador ultrasónico marca BRANSON modelo 250 D 117
- Espectrofotómetro de infrarrojo FTIR-ATR, marca Thermo Scientific modelo Nicolet is50 FT-IR
- Equipo de difracción de Rayos X marca Ultima IV, modelo Rigaku
- Equipo para análisis termogravimétricos marca TA instruments, modelo Discovery 5500TGA
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC) marca TA Instruments, modelo 2500 Discovery
- Equipo dispersor de luz (DLS) marca Microtrac modelo Wave II Q
- Espectrofotómetro por inducción de plasma modelo Thermo Jarrel Ash modelo 7400 (ICP-OES)
- Lector de carga de partículas marca Microtrac, modelo ZETA-Check
- Liofilizadora marca LANCONCO modelo Fresona 2.5
- Homogeneizador FASTPREP-24 5G N Marca MP BIOMEDICAS
- Centrifuga Spectrafuge 24D marca Labnet
- Espectrofotómetro microplate reader marca BioTek modelo EPOCH2

6.2 Reactivos

6.2.1 Reactivos para la síntesis y caracterización de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

- Quitosán marca Marine Chemicals (Kerala, India), peso molecular 200,000 g/mol.

- Tripolifosfato de Sodio anhidro (grado técnico 85%), marca SIGMA-ALDRICH, PM=367.86 g/mol.
- Sulfato cobaltoso heptahidratado ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), marca FERMONT, PM=281.1 g/mol.
- Molibdato de sodio dihidratado ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), marca FERMONT, PM=241.95 g/mol.
- Sulfato níqueloso hexahidratado grado analítico >98% ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), marca SIGMA-ALDRICH, PM=262.86 g/mol.
- Ácido nítrico concentrado, marca FERMONT
- Tween al 1%

6.2.2 Reactivos para la caracterización de las propiedades bioquímicas de las plántulas de melón

- Metanol
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Ácido gálico
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)
- Reactivo de Bradford
- Albumina de suero bovino
- Fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4)
- Fosfato de potasio monobásico (K_2HPO_4)
- Polivinilpolipirrolidona (PVPP).

6.3 Metodología

6.3.1 Preparación de las soluciones para la síntesis de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

Solución de quitosán al 0.5 % p/v. Se midieron 250 mL de una solución de quitosán al 2 % (p/v), los cuales se filtraron y se aforaron a 1 L con agua destilada.

Tripolifosfato de sodio (TPP) al 1 % (p/v). Se pesaron 10 g de TPP, los cuales se disolvieron en 250 mL de agua destilada y se aforaron a 1 L en un matraz de aforación.

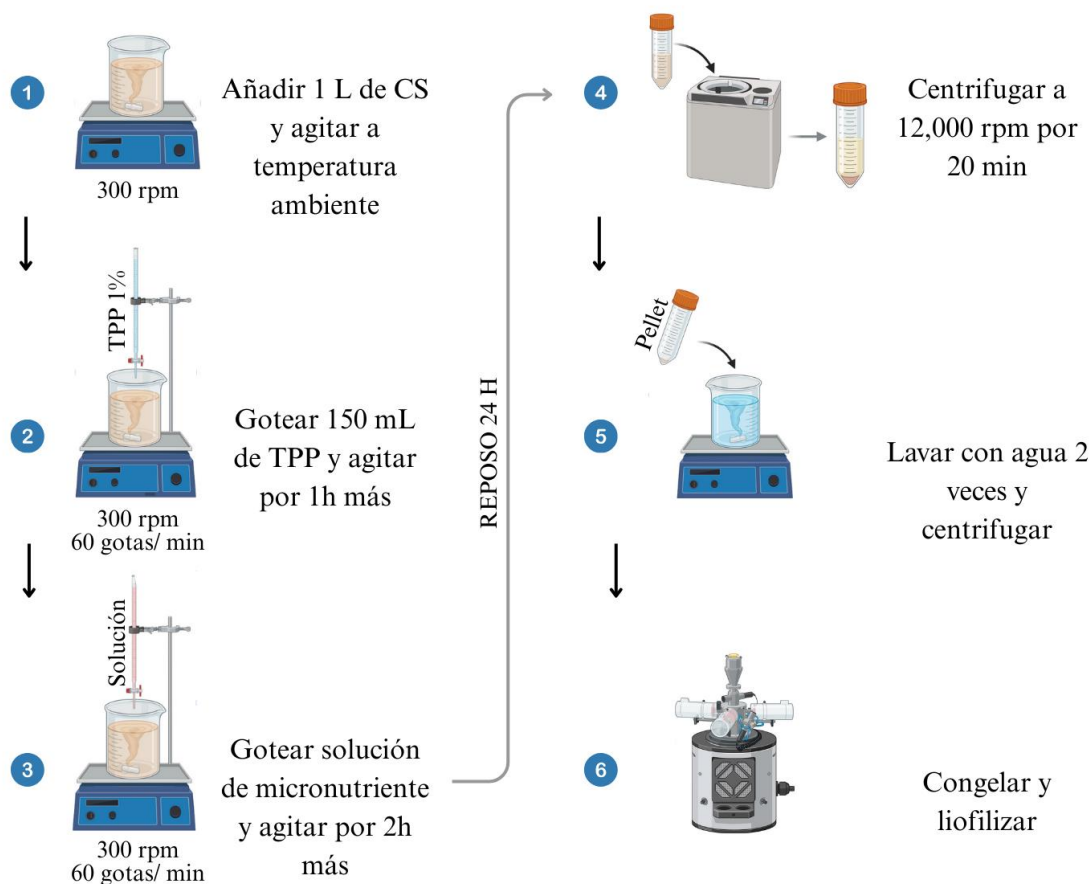
Sulfato níqueloso. La solución se preparó disolviendo 2.63 g de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada y posteriormente se aforó a 100 mL. Esta solución madre (0,1 M) se diluyó en una proporción 1:10 para obtener una solución al 0.01 M.

Sulfato cobaltoso. Se pesaron 2.81 g de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, los cuales se disolvieron en agua desionizada a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se aforó a 100 mL. A partir de esta solución madre (0.1 M) se preparó una solución de 0,01 M.

Molibdato de sodio. Se pesaron 2.42 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, los cuales se disolvieron en agua desionizada. Una vez disuelto completamente, la solución se aforó a 100 mL. Esta solución madre (0,1 M) se diluyó en una proporción 1:10 para obtener una solución de 0,01 M.

6.3.2 Síntesis de nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

Las nanopartículas de quitosán (NPsCS) se sintetizaron mediante el método de gelación iónica, utilizando quitosán (CS) con un peso molecular viscosimétrico de 200,000 g/mol y tripolifosfato de sodio (TPP), de acuerdo con el procedimiento mostrado en el Esquema 2. Inicialmente, se utilizó 1 L de una solución de quitosán al 0,5 % (p/v) en ácido acético al 1 % (v/v), la cual se agitó en una parrilla magnética a 300 rpm. Posteriormente, se añadieron 150 mL de TPP al 1 % (p/v) mediante goteo controlado (60 gotas por min). Una vez finalizada la adición, la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h para favorecer el entrecruzamiento entre el CS y TPP. Esta mezcla se llevó a centrifugación a una velocidad de 12,000 rpm a temperatura ambiente durante 20 min, se retiró el sobrenadante conservando el precipitado y se lavó con agua desionizada para nuevamente centrifugarse bajo las mismas condiciones (12,000 rpm; 25°C por 20 min). Este procedimiento se repitió hasta completar dos ciclos de lavado. El precipitado final se liofilizó y se pesó. Las NPsCS-Ni, NPsCS-Co, NPsCS-Mo y NPsCS-Trip se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento que para las NPsCS, agregando mediante goteo las sales de sulfato níqueloso, sulfato cobaltoso y molibdato de sodio posterior al entrecruzamiento del CS y el TPP para cada caso. Después de agregar cada sal, la mezcla se dejó en agitación por 2 h a 300 rpm y se mantuvo en reposo durante 24 h. Posteriormente, cada mezcla se lavó y se centrifugó durante 20 min. y dos ciclos de lavado con agua desionizada para retirar el material residual, luego se congeló para ser liofilizado.



Esquema 2. Síntesis de nanopartículas de quitosán por el método de gelación iónica.

Para sintetizar las nanopartículas de quitosán con níquel (NPs-CS-Ni), se añadieron 51.15 mL de sulfato de níquel al 0,01 M (30 ppm). Para las nanopartículas de quitosán con cobalto (NPs-CS-Co), se añadieron 33.95 mL de sulfato de cobalto al 0,01 M (20 ppm) y para obtener las nanopartículas de quitosán con molibdeno (NPs-CS-Mo), se incorporaron 3.13 mL de molibdato de sodio al 0.01 M (3 ppm). Finalmente, para sintetizar las nanopartículas de quitosán con los tres metales (NPs-CS-Trip), se añadió el mismo volumen de solución de trabajo utilizado en cada una de las reacciones anteriores, agregando las soluciones una a una, con intervalos de agitación de 1 h, siguiendo el mismo orden de adición.

6.3.3 Preparación de soluciones de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) para su aplicación en semillas y plántulas de melón

Solución de NPsCS al 0.1 % (p/v). Se dispersaron 1 g de NPsCS y 10 gotas de tween al 1% en 200 mL de agua destilada con ayuda de una punta de ultrasonido, en 3 ciclos de 2 min, a una amplitud de onda de 60 %, posteriormente se llevó a un volumen de 1000 mL y se almacenó en un recipiente de plástico.

Solución de NPsCS-Ni al 0.1 % (p/v). Con ayuda de una punta de ultrasonido, se dispersaron 1 g de NPsCS-Ni y 10 gotas de tween al 1% en 200 mL de agua destilada, se sonico durante 3 ciclos de 2 min cada uno a una amplitud de onda de 60 %, finalmente se completó un volumen de 1000 mL y se reservó en un recipiente de plástico.

Solución de NPsCS-Co al 0.1 % (p/v). Con ayuda de una punta de ultrasonido se dispersaron 1 g de NPsCS-Co y 10 gotas de tween al 1% en 200 mL de agua destilada, la mezcla se sonico durante 3 ciclos de 2 min cada uno a una amplitud de onda de 60 %, después se llevó a un volumen de 1000 mL y se almacenó en un recipiente de plástico.

Solución de NPsCS-Mo al 0.1 % (p/v). Con ayuda de una punta de ultrasonido, se dispersaron 1 g de NPsCS-Mo y 10 gotas de tween al 1% en 200 mL de agua destilada, se sonicaron, durante 3 ciclos de 2 min cada uno, a una amplitud de onda de 60 %, luego se completó un volumen de 1000 mL y se reservó en un recipiente de plástico.

Solución de NPsCS-Trip al 0.1 % (p/v). Se dispersaron 1 g de NPsCS-Trip y 10 gotas de tween al 1% en 200 mL de agua destilada con ayuda de una punta de ultrasonido, se sonico durante 3 ciclos de 2 min a una amplitud de onda de 60 %, posteriormente se llevó a un volumen de 1000 mL y se almacenó en un recipiente de plástico.

6.4 Caracterización de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

6.4.1 Determinación del tamaño de las NPsCS por dispersión de luz dinámica (DLS)

El tamaño de las partículas de NPsCS y de los NPsCS-Mi se determinó pesando 50 mg de muestra y se agitaron en 30 mL de agua desionizada durante 24 h, luego se dispersaron con una punta de ultrasonido con 60 % de amplitud durante 3 ciclos de 3 min cada uno. Después se tomaron aproximadamente 2 mL de cada dispersión y se colocaron en una celda de cuarzo para

su posterior análisis en el equipo de DLS, en donde, las muestras se analizaron durante 100 s, a temperatura ambiente, utilizando un índice de refracción de 1.648.

6.4.2 Potencial Zeta de las NPsCS-Mi

Se pesaron 50 mg de muestra y se agitaron en 30 mL de agua desionizada durante 24 h, después se dispersaron con una punta de ultrasonido con 60 % de amplitud durante 3 ciclos de 3 min cada uno. Después se agregaron aproximadamente 20 mL de cada dispersión al portamuestras del equipo usando un pistón de 0.4, la medición tuvo un tiempo de 5 min por muestra y se realizó a temperatura ambiente.

6.4.3 Espectrometría de absorción atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

El contenido de Ni, Co y Mo presente en las muestras de NPsCS y de NPsCS-Ni, NPsCS-Co, NPsCS-Mo se determinó mediante, la técnica de ICP-OES. Para cada compuesto metálico se realizó una digestión ácida, la cual consistió en pesar 500 mg de muestra en polvo en un vaso de precipitado y se agregaron 30 mL de ácido nítrico concentrado, indicando en el vaso de precipitado el volumen inicial. Cada uno de los compuestos se llevó a ebullición a aproximadamente a una temperatura de 320 °C, en todo momento se mantuvo el volumen inicial de ácido nítrico, hasta observar la degradación total de la materia orgánica. Después de la degradación total de la muestra, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se filtraron usando papel Wathman número 42 y se aforaron a 50 mL con agua desionizada para finalmente ser envasadas en pequeños frascos de polietileno.

6.4.4 Espectroscopia infrarrojo por transformadas de Fourier acoplado a reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

Se colocan aproximadamente 0.05 g en el portamuestras del equipo para observar los grupos químicos de las NPsCS y de los compuestos de nanopartículas de quitosán con Ni, Co y Mo. Las muestras se corrieron a la condición de 25 escáneres, resolución de 4 cm⁻¹ y un rango de 400 - 4000 cm⁻¹.

6.4.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

El comportamiento térmico de las NPsCS y de las nanopartículas de quitosán con Ni, Co y Mo se estudió colocando la muestra en polvo en una bandeja de platino a una velocidad de calentamiento de 10°C/min de 30 a 600 °C. Con esta caracterización se examinó la estabilidad térmica y las etapas de descomposición de los compuestos de nanopartículas.

6.4.6 Calorimetría diferencial de barrido diferencial (DSC)

Para el análisis térmico mediante DSC, se colocaron 0.01 g de muestra en polvo en charolas desechables de aluminio; se corrieron en un rango de temperatura de 25 a 300 °C

6.4.7 Difracción de Rayos X (XRD)

La estructura cristalina de las NPsCS y de las nanopartículas de quitosán con Ni, Co y Mo se determinó colocando el sólido (polvo) en un portamuestra de vidrio y, se analizaron con ayuda de un difractómetro a un ángulo de 5 a 60° en 2θ, utilizando un voltaje de 40 Kv, mA de 44 y Kw igual a 1.76

6.4.8 Aplicación de nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) en semillas de melón

Se usaron semillas de melón de la variedad Sweet Sunrise de la casa comercial SYNGENTA®. Las semillas se imbibieron en las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Ni, NPsCS-Co y NPsCS-Mo).

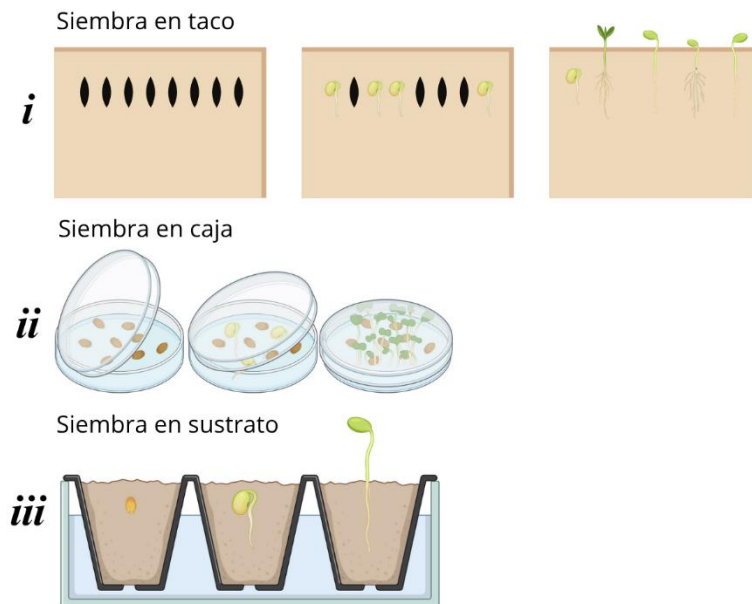
Previamente, las semillas de melón se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) durante 5 min y se enjuagaron con abundante agua corriente por tres veces; posteriormente se les quitó el exceso de agua y se distribuyeron en 6 frascos de 50 mL (correspondientes a cada solución de NPsCS-Mi y a un blanco) para dejarse en imbibición por 48 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de imbibición, se escurrieron y secaron las semillas para sembrarse. La evaluación del crecimiento se realizó por tres métodos de germinación: *i)* cultivo en caja, *ii)* cultivo en taco y *iii)* cultivo en sustrato, llevándose a cabo observaciones cada 72 h.

i) Cultivo en taco. Sobre un papel no tóxico de la marca Anchor (25 cm × 30 cm), previamente humedecido con 15 mL de agua estéril, se colocaron 15 semillas de melón

previamente imbibidas, alineadas en hilera a lo ancho del papel, con 2 cm de separación entre ellas y 6 cm de distancia respecto al borde superior. Después de colocar las semillas, el papel se enroló en forma de tubo o "taco" y se coloca en una bolsa de polietileno. Se prepararon tres tacos por cada tratamiento, con 15 semillas por taco, incluyendo cinco tratamientos y un control. Los tacos fueron almacenados de manera aleatoria en bandejas dentro de una cámara de germinación a 28 °C, con un fotoperiodo de 18 h de luz blanca y 6 h de oscuridad.

ii) Cultivo en caja. En una caja Petri estéril de plástico de 10 cm de diámetro se sembraron 10 semillas de melón previamente imbibidas en cada uno de los tratamientos (NPsCS-Ni, NPsCS-Co, NPsCS-Mo y NPsCS-Trip), bajo condiciones estériles. Las semillas se colocaron sobre tres discos de papel filtro del mismo diámetro, humedecidos con 5 mL de agua estéril. Posteriormente, la caja se cerró y selló con parafilm, incubándose a 28°C con un fotoperiodo de 18 horas de luz blanca y 6 horas de oscuridad. Se sembraron tres cajas por triplicado de cada tratamiento, incluyendo cinco tratamientos y un control con agua, considerando cada caja como una unidad experimental.

iii) Cultivo en sustrato. Se preparó un sustrato con perlita y peat moss en una relación 1:3, el cual fue esterilizado a 15 lb/ft² durante 15 minutos. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se humedeció con agua estéril hasta alcanzar el punto de saturación y se distribuyó en charolas germinadoras de 2 × 3 pozos. En cada pozo, se sembró una semilla a una profundidad de 5 mm. Las charolas se incubaron a 28 °C, con un fotoperiodo de 18 h de luz blanca y 6 horas de oscuridad. Cada unidad experimental consistió en 6 pozos (con 6 semillas), y este procedimiento se repitió tres veces para cada tratamiento y el grupo control.



Esquema 3. Sistemas de cultivo: *i)* cultivo en caja, *ii)* cultivo en taco y *iii)* cultivo en sustrato.

6.4.9 Aplicación foliar de nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) en plántulas de melón

La aplicación de los compuestos de nanopartículas de quitosán con micronutrientes en plántulas de melón se realizó mediante aspersión directa sobre el tejido foliar. Cada tratamiento se aplicó a plántulas con 15 días de germinación. A continuación, se detalla el procedimiento:

1. Plántulas de melón. Las semillas de melón primero se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) durante 10 minutos. Luego, se enjuagaron tres veces con agua corriente y se dejaron secar. Posteriormente, se imbibieron en agua estéril en un frasco de vidrio durante 24 h a temperatura ambiente, luego las semillas se escurrieron y sembraron en el sustrato previamente preparado.

2. Preparación del sustrato. Se hace a partir de una mezcla de Peat moss y perlita en una proporción 1:3 homogenizando manualmente. Luego, el sustrato se esterilizó a 15 lb/ft² durante 15 min. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se humedeció con agua destilada hasta alcanzar el punto de saturación y se distribuyó en charolas germinadoras. Se colocaron tres semillas de melón en cada cavidad de la charola y se incubaron durante 15 días en una cámara de germinación a 28 °C, con un fotoperiodo de 18 h de luz y 6 h de oscuridad. El riego consistió en la aplicación de 5 mL de agua destilada cada 7 días y 5 mL de solución nutritiva de Hoagland con la misma frecuencia.

3. Aplicación de tratamientos: Después de 15 días de germinación, la charola se dividió en grupos de seis cavidades (2×3), con al menos seis plántulas por grupo, considerándose cada grupo como una unidad experimental. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones, y cada repetición incluyó al menos seis plántulas. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: 1) tratamiento control con agua, 2) NPsCS sin micronutrientes, 3) NPsCS-Ni, 4) NPsCS-Co, 5) NPsCS-Mo y 5) NPsCS-Trip (NPsCS-Ni-Co-Mo). Las soluciones se aplicaron por aspersión con un atomizador, aplicando a cada grupo aproximadamente 6 mL sobre las hojas.

La aplicación se realizó en dos sesiones, con un intervalo de 7 días entre cada una. Después de la aplicación, las plántulas se dejaron en ventilación durante 40 min antes de colocarlas en la incubadora, manteniendo las mismas condiciones de germinación. El riego posterior se realizó directamente sobre el sustrato, aplicando 5 mL de agua destilada cada 72 h y 5 mL de solución nutritiva cada 7 días.

6.4.10 Determinación de las propiedades morfológicas de las plántulas de melón tratadas con nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

Índice de germinación. Para evaluar el efecto de las NPsCS y NPsCS-Mi sobre el índice de germinación de las semillas de melón, se realizaron observaciones periódicas cada 72 h para identificar la ruptura del tegumento y formación de estructuras de las plántulas (raíz y tallo). Para los sistemas de cultivo en caja y en taco, se contabilizó a partir de la aparición de la radícula (3 mm elongación, aproximadamente) y para el sistema de cultivo en sustrato, el alargamiento del hipocótilo, así como el crecimiento de los cotiledones.

Crecimiento vegetal. El efecto de las NPsCS y NPsCS-Mi sobre el crecimiento vegetal se analizó a través de la longitud de la raíz primaria y tallo, además de la aparición de hojas verdaderas, y del vigor de la planta.

Para el sistema de cultivo en taco, se midió con un vernier la longitud de la raíz (radícula) y la elongación del tallo hasta la aparición del hipocótilo. Se realizaron observaciones cada 72 h y se registró su progreso durante 15 días de crecimiento.

En el sistema de cultivo en caja, se evaluó cualitativamente la ruptura del tegumento y la aparición de las estructuras (radícula, hipocótilo, cotiledones y primera hoja), sin abrir las cajas para evitar interferencias. Este análisis se realizó hasta el día 15 de crecimiento, momento en el

cual se retiraron las plántulas de la caja y se midieron las estructuras (raíz y tallo) utilizando un vernier.

En el sistema de cultivo en sustrato, se evaluó el crecimiento mediante la medición de la elongación del tallo, la aparición de los cotiledones y la primera hoja, así como la vigorosidad de las plántulas. Las mediciones se realizaron con un vernier, desde el nodo de la radícula y el hipocótilo hasta los cotiledones o, en su caso, hasta la yema apical. Todas las observaciones se realizaron cada 72 h bajo condiciones de luz y temperatura ambiente.

Biomasa y porcentaje de humedad. A los 15 días después de la siembra, se separa el tejido radicular y la parte aérea (hojas y tallos) de las plántulas, posteriormente las muestras se pesaron y se agrupan por: *i)* sistema, *ii)* tratamiento y *iii)* repetición. Las muestras, se llevaron a secar en bolsas de papel en una estufa a temperatura de 50 °C durante 7 días para posteriormente pesar los tejidos totalmente secos y con ellos calcular por diferencia de peso el porcentaje de humedad y la cantidad de biomasa seca.

6.4.11 Determinación de las variables bioquímicas de las semillas y plántulas de melón tratadas con las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

Para llevar a cabo las técnicas de capacidad antioxidante, fenoles totales y determinación de pigmentos (clorofilas y carotenoides) inicialmente se realizó un extracto de los tejidos vegetales (radicular y parte aérea) como se explica en seguida.

Preparación del extracto vegetal. Las muestras se dividieron en tres secciones considerando el tipo de tejido (radicular o parte aérea) por: *i)* sistema, *ii)* tratamiento y *iii)* repetición. Para la preparación del extracto, se tomaron 150 mg de muestra y se añadió 1 mL de metanol al 80 % a una temperatura de 4 °C e inmediatamente la muestra se coloca en un homogeneizador a una velocidad de 6 m/s durante 15 s. Posteriormente, se centrifugó a 3000 g y 4 °C durante 5 min. Con cuidado, se extrajo el sobrenadante y se realizaron las diluciones pertinentes, las cuales se mantuvieron a 4 °C en todo momento.

Extracto vegetal para la cuantificación de proteínas. En un microtubo, se pesaron 100 mg de muestra y se agregaron 150 µL de PVP al 4 % (p/v) y 1 mL de solución estabilizadora. Esta mezcla se homogenizó durante 15 s a 6 m/s y, de inmediato, se centrifugó a 4°C a 3000 g durante 15 min. Para su análisis, se realizaron diluciones del extracto, el cual se mantiene a 4 °C.

Reactivo de Folin-Ciocalteu, 1:10. En un frasco ámbar se agregaron 10 mL del reactivo y 100 mL de agua destilada. La solución se homogenizó y se refrigeró a 4 °C hasta su uso.

Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3). 1.875 g de carbonato de sodio se disuelven en 10 mL de agua destilada; posteriormente, se afora a 25 mL y se almacena para su uso posterior.

Solución de DPPH. Se preparó una solución de 125 μM disolviendo 2.4 mg de DPPH en 4 mL de metanol en un tubo ámbar. La mezcla se homogenizó y se midió su concentración mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 515 nm, obteniendo un valor de absorbancia de 1.1, lo que indicó una concentración óptima.

Capacidad antioxidante. A un extracto de la muestra se le agrega 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), el cual desencadena un mecanismo en donde los agentes antioxidantes actúan para inhibir la oxidación de los lípidos, eliminando así al radical DPPH. Cada una de las muestras se evaluaron en una microplaca de 96 pozos, agregando 50 μL del extracto vegetal con 150 μL de solución de DPPH. Posteriormente se dejó reaccionar por 15 minutos y se leyó a 515 nm en un equipo lector de microplaca, según la metodología de Brand Williams (Brand-Williams et al., 1995). Para calcular la capacidad antioxidante, se hizo una curva de calibración, y mediante la ecuación de la recta ($y=mx+b$), se determinó la cantidad de antioxidantes por mg de tejido.

Fenoles totales. Metodología de Singlenton & Rossi (1965). Se agregaron 20 μL del extracto vegetal y 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu a una dilución 1:10 (v/v), se dejaron reaccionar durante un minuto para después agregarse 80 μL de solución de carbonato de sodio al 7.5% (p/v), se dejó reposar la mezcla por 30 minutos y luego se leyó en un lector de microplaca a una absorbancia de 765 nm. Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico y a partir de la ecuación de la recta se hizo el cálculo para obtener la concentración de fenoles totales en mg mL^{-1} .

Clorofila. La determinación de pigmentos se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Hartmut y Wellburn en 1985 (Soto et al., 2023) utilizando el extracto vegetal de cada muestra, la cual se coloca en una microplaca para la determinación de clorofila a se lee a una longitud de onda de 665.2 nm, para clorofila b a 652.4 nm y los carotenos a 470 nm.

Los cálculos se realizaron usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a = 16.72 (A_{665\text{nm}}) - 9.16 (A_{652 \text{ nm}})$$

$$\text{Clorofila } b = 34.09 (A_{652\text{nm}}) - 15.28 (A_{652 \text{ nm}})$$

Donde: A es la absorbancia obtenida a las diferentes longitudes de onda (665, 652 y 470 nm).

Proteínas totales. Se determinan con la metodología de Bradford, donde se cuantifica la reacción del colorante azul de Coomassie G-250) con los residuos de aminoácidos (especialmente arginina). Para la determinación de proteínas totales, se mezclaron 155 μL de agua destilada, 45 μL de colorante de Bradford y 25 μL del extracto vegetal de la muestra, dejándose reaccionar durante 10 min, posteriormente se realizó la lectura de la muestra a una longitud de 595 nm en el lector de microplaca. Por último, sustituyendo el valor de la absorbancia de cada muestra en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración con Albumina de suero bovino, se obtiene la cantidad de proteína total en mg.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

7.1.1 Determinación del rendimiento de las NPsCS-Mi, potencial Z y tamaño de partículas.

En la Tabla 1 se presentan los rendimientos de las nanopartículas de quitosán (NPsCS) y de las NPsCS coordinadas con los micronutrientes. El rendimiento inicial de las NPsCS fue del 29.22 %, el cual aumentó con la adición de micronutrientes metálicos: 37.8 % para NPsCS-Ni, 34.22 % para NPsCS-Co, 37.51 % para NPsCS-Mo, y 45.65 % para las NPsCS-Trip (complejo con Ni, Co y Mo). El incremento en el rendimiento puede atribuirse a la formación de redes reticuladas más eficientes durante la síntesis, como resultado de las interacciones químicas entre los iones metálicos (metales de transición con estados de oxidación +2 o +3) y los grupos funcionales del quitosán, principalmente aminas (-NH₂) e hidroxilos (-OH). Estas interacciones incluyen enlaces iónicos, enlaces de coordinación y fuerzas de Van der Waals, que favorecen el crecimiento de cadenas poliméricas y una nucleación más controlada, lo cual resultó en una mayor eficiencia de síntesis y un aumento en el rendimiento final del material (Abd El-Aziz *et al.*, 2019; Duhan *et al.*, 2017).

Tabla 1. Rendimiento, tamaño de partícula y potencial Z de las NPsCS y de los complejos de NPsCS-Ni, NPsCS-Co y NPsCS-Mo y NPsCS-Trip.

Muestra	Rendimiento (%)	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Z
NPsCS	29.22	265 -1635	37.7 ± 0.6
NPsCS-Ni	37.8	465 -4620	30.0 ± 2
NPsCS-Co	34.22	204 -1150	29.9 ± 2
NPsCS-Mo	37.51	409- 2120	29.7 ± 2
NPsCS-Trip	45.65	530	28.4 ± 2

Respecto al tamaño de partícula y carga superficial (potencial Zeta), las NPsCS presentaron un tamaño promedio de 256 nm y una carga de $+37.7 \pm 0.6$ mV, valores típicos que nos indican una buena estabilidad coloidal, atribuida a la protonación de los grupos amino del quitosán (Yang *et al.*, 2025). Las condiciones de síntesis, como el pH, la velocidad de agitación y la naturaleza del agente reticulante, pueden afectar tanto el tamaño como el potencial Zeta (Samah *et al.*, 2023).

Al incorporar los micronutrientes, se observaron variaciones importantes. Las NPsCS-Ni mostraron un incremento en el tamaño a 465 nm y una disminución en la carga a $+30.0 \pm 2$ mV. Las NPsCS-Co, aunque con una carga similar ($+29.9 \pm 2$ mV), no presentaron un aumento significativo en el tamaño (204 nm). En cambio, las NPsCS-Mo mostraron un tamaño mayor (456 nm) con una ligera disminución en la carga ($+29.7 \pm 2$ mV). Finalmente, las NPsCS-Trip, que contenían los tres metales, presentaron el mayor tamaño (530 nm) y la menor carga superficial ($+28.4 \pm 2$ mV), lo cual sugiere una mayor coordinación de los metales en las cadenas del quitosán.

El incremento en el tamaño de partícula está asociado a la capacidad de los metales de transición (como Ni, Co y Mo) para formar enlaces de coordinación con los grupos funcionales del quitosán, lo que puede alterar la densidad de la red polimérica. Además, los ligandos metálicos asociados, como aniones o moléculas de agua, pueden establecer puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del quitosán, incrementando la hidratación y expandiendo la matriz, lo que contribuye a un mayor tamaño de las partículas (Ali *et al.*, 2011).

El potencial Zeta es clave para entender la estabilidad y comportamiento coloidal de las nanopartículas. Una mayor carga superficial implica mayor repulsión entre partículas, evitando su aglomeración. Sin embargo, al formar complejos con metales, la carga disminuye debido a la interacción entre los grupos polares del quitosán (positivos) y los iones metálicos o aniones absorbidos en medio acuoso, que suelen tener carga negativa. Esto genera una neutralización parcial de cargas, disminuyendo el potencial Zeta (Ding *et al.*, 2019; Djanaguiraman *et al.*, 2024). En el caso específico de las NPsCS-Trip, la incorporación simultánea de tres metales podría haber provocado competencia por los sitios de enlace y mayor desorden estructural, resultando en una red menos estable, partículas más grandes y menor carga superficial (Samah *et al.*, 2023). Esta pérdida de estabilidad puede tener implicaciones en la bioactividad y la interacción con las membranas celulares (Djanaguiraman *et al.*, 2024).

7.1.2 Determinación de microelementos por espectrometría de absorción atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

La concentración de los micronutrientes (Ni, Co y Mo) contenidos en las muestras de NPsCS-Mi, se determinó mediante ICP-OES. Como se muestra en la Tabla 2, las NPsCS-Ni y NPsCS-Co absorbieron cerca del 70% de la cantidad de micronutrientes añadido durante la síntesis, con una concentración real de 20.63 y 13.82 ppm, respectivamente. En el caso de las NPsCS-Mo, se detectó una concentración de 3.149 ppm, ligeramente superior al valor teórico añadido (3 ppm). Este incremento puede estar relacionado con la ausencia de condiciones controladas durante la preparación, lo que aumenta la probabilidad de variaciones experimentales. Asimismo, trabajar con concentraciones bajas puede aumentar los márgenes de error experimental (H. Snow, 2022) Por otra parte, las NPsCS-Trip, absorbieron cerca de 50 % de la cantidad de micronutrientes de manera individual, es decir, se redujo la concentración de Ni, Co y Mo a 11.56, 8.46 ppm y 0.76 ppm, respectivamente. La reducción en el porcentaje de absorción de los micronutrientes en las NPsCS-Trip se puede atribuir al mecanismo de “competencia” de interacción de los iones por los grupos funcionales disponibles en la cadena reticulada de CS durante la síntesis.

Tabla 2. Determinación del contenido de micronutrientes (Ni, Co y Mo) por espectrometría de absorción atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

Muestra	Microelemento	Cantidad teórica (ppm)	Cantidad real (ppm)
NPsCS-Ni	Ni	30	20.64
NPsCS-Co	Co	20	13.82
NPsCS-Mo	Mo	3	3.15
NPsCS-Trip	Ni	30	11.56
	Co	20	8.46
	Mo	3	0.76

La coordinación o formación de complejos de micronutrientes (iones metálicos) con las nanopartículas de CS está relacionada con las características fisicoquímicas propias del CS y de

las NPsCS, con factores internos como el grado de desacetilación y disponibilidad de grupos funcionales (—NH y —OH), peso molecular o cristalinidad, y factores externos como el método de síntesis, agente reticulante, velocidad de agitación y pH. Estos factores pueden modificar las interacciones entre los iones metálicos y las cadenas de CS, favoreciendo o no su integración en los complejos. El peso molecular del CS influye en sus propiedades fisicoquímicas, un menor peso molecular mejora la disponibilidad de los grupos amino (J. Wang et al., 2024). NO ESTÁ LA REF. lo cual le confiere mayor habilidad de interacción, mejorando sus cualidades antioxidantes, antimicrobianas y quelantes (Mármol et al., 2012).

7.1.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier acoplado a reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

En la Figura 1 se muestra el espectro de infrarrojo del quitosán prístino (a) presentó las bandas características del biopolímero, la señal en 3430 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento sobrepuestas de los grupos O—H y N—H . La vibración de estiramiento alifático C—H de los grupos metileno apareció en 2870 cm^{-1} , mientras que la banda de la amida I se registró en 1625 cm^{-1} , asociada al estiramiento del enlace C=O . La absorción en 1533 cm^{-1} se asignó a la flexión N—H (amida II), y la señal a 1375 cm^{-1} a la flexión C—H . En la región de los sacáridos, se observó una banda intensa a 1048 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C—O—C de los enlaces glucosídicos, en concordancia con lo reportado en la literatura para el quitosán (Lustriane et al., 2018; Verma et al., 2021).

Por otra parte, las NPsCS (b) presentan la banda ancha correspondiente al estiramiento O—H/N—H en 3034 cm^{-1} , la cual se hizo más ancha e intensa, indicando un incremento en los enlaces de hidrógeno, las bandas de amida I (1625 cm^{-1}) y amida II (1533 cm^{-1}) se volvieron más definidas, lo cual refleja interacciones iónicas entre los grupos —NH_3^+ protonados del quitosán y los aniones fosfato del TPP. Además, apareció una señal nueva en 881 cm^{-1} atribuida principalmente al estiramiento asimétrico de los grupos P—O—P del TPP, con posible solapamiento de los enlaces $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$ glucosídicos (Lustriane et al., 2018). Estos cambios confirman la reticulación iónica del quitosán con TPP y la formación de las nanopartículas de quitosán.

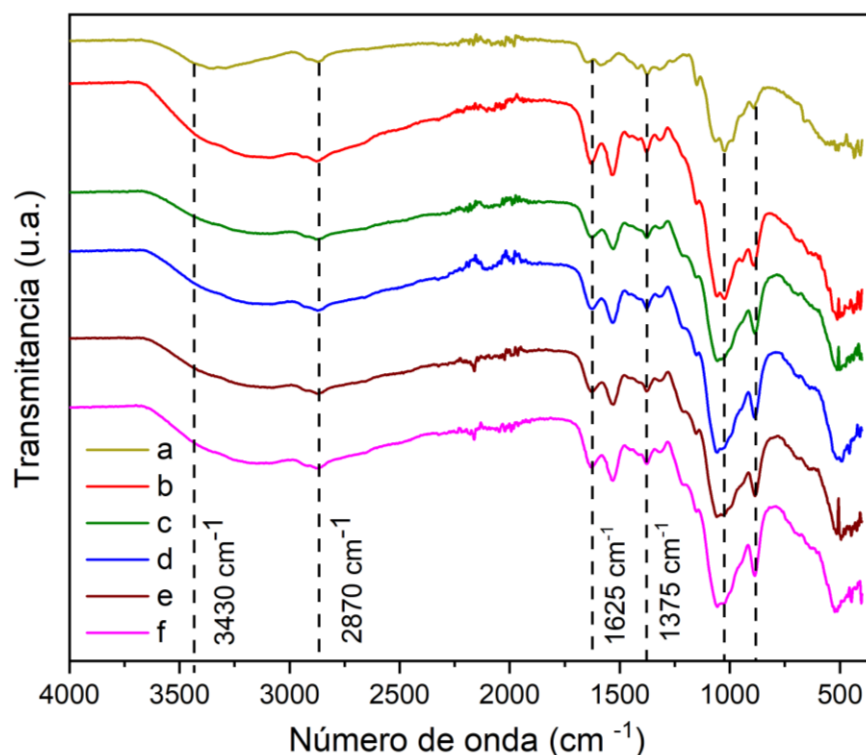


Figura 1. Espectro de infrarrojo del quitosán (a), NPsCS (b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Co (d), NPsCS-Mo (e) y NPsCS-Ni, Co, Mo (f).

Los complejos metálicos de CSNPs-Ni, CSNPs-Co, CSNPs-Mo y CSNPs-Ni, Co, Mo conservaron las características fundamentales de las CSNPs, lo cual indica que la estructura química principal del quitosán no se modificó tras la incorporación de los metales. No obstante, se observaron variaciones en la intensidad de las bandas, particularmente en la región asociada a C–H y a los grupos fosfato, donde las señales aparecieron más pronunciadas en los complejos. Este comportamiento se relaciona con las interacciones iónicas y de coordinación más fuertes entre los cationes multivalentes (Ni^{2+} , Co^{2+} y especies de Mo) y los grupos funcionales del quitosán.

Un aspecto relevante en el espectro de infrarrojo de los CSNPs-Mi es la aparición de cambios en la región de baja frecuencia ($563\text{--}550\text{ cm}^{-1}$), ausentes en las CSNPs sin metales. Estas señales se han asociado a las vibraciones de estiramiento M–O y M–N, lo que proporciona evidencia adicional de la coordinación de Ni, Co y Mo con los grupos amino e hidroxilo del quitosán (Hussein et al., 2012; LEÓN et al., 2017; Verma et al., 2021).

El análisis FTIR confirma que, si bien el esqueleto químico del quitosán se mantiene, la reticulación con TPP y la posterior coordinación con los iones metálicos producen modificaciones claras en las regiones de amida, fosfato e infrarrojo a baja frecuencia, validando tanto la formación de CSNPs como su complejación efectiva con micronutrientes metálicos.

7.1.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

Para estudiar los cambios térmicos entre las muestras de CS, NPsCS y NPsCS-Mi se realizó un análisis termogravimétrico (Figura 2). El Termograma perteneciente al quitosán muestra dos pérdidas de peso en el rango de temperatura de 33 a 430 °C, la primera pérdida ocurre por debajo de los 100 °C que corresponde a la humedad contenida en la muestra representando cerca del 11% de su peso. La segunda pérdida está relacionada a la degradación primaria del quitosán que comienza a los 233 °C y es completamente degradado a los 430 °C con una pérdida de peso de 58.5%, en donde se llega a la carbonización total a los 600 °C, perdiendo finalmente el 33% de su peso de la muestra. El TGA de las NPsCS también exhibe dos pérdidas de peso significativas en el rango de 30 a 470 °C, la primera pérdida es consecuencia de la evaporación del agua absorbida por la muestra, que se observa entre los 30 y 100 °C, y representa el 9.6% de su peso. La segunda pérdida significativa de peso (cerca del 41%) se da en el rango de 160 a 470 °C, la cual es atribuida a la descomposición y degradación de cadenas poliméricas libres del quitosán, que derivan en la ruptura de los enlaces de hidrogeno entre los N-acetil y los grupos amino libre, así como de la gradual degradación oxidativa de carbonos residuales y de productos formados en procesos previos. Por otro lado, la existencia de grupos fosfato (P=O y P-O) en las NPsCS resulta en menor degradación que el quitosán (Kahdestani et al., 2021). Es importante mencionar que la temperatura de inicio de degradación de las NPsCS ocurre antes (alrededor de 160 a 470 °C) debido a su naturaleza amorfa adquirida por el entrecruzamiento con las moléculas TPP. Además, la reducción en la estabilidad térmica de las nanopartículas de quitosán en comparación con el quitosán puro puede estar relacionado con algunos desórdenes en su estructura semi cristalina (Mihaela Predescu et al., 2019; Xiao et al., 2016).

Por otra parte, los comportamientos de degradación de las NPsCS-Mi son similares al observado en las NPsCS debido al mismo método de síntesis de los compuestos. Siendo así que, el termograma TGA de las NPsCS-Ni muestra dos periodos de pérdida de peso, el primer periodo

atribuido a la evaporación de agua que se da entre los 37 y 120 °C en el cual hay una pérdida de peso del 7.1%, menor a la cantidad de agua perdida en las NPsCS y CS. En el segundo periodo se da la degradación primaria del material a un rango de temperatura de 160 a 430 °C, con una pérdida de peso del 44%, también menor al observado en las NPsCS y al CS, por lo cual, a pesar de tener un menor rango de temperatura de degradación son mayormente estables debido a la presencia de compuestos inorgánicos (níquel y fosforo (TPP)) (Ali et al., 2011).

De manera similar a las NPsCS, las NPsCS-Co presentan una primera pérdida de peso atribuida a la evaporación del agua absorbida. Esta pérdida comienza alrededor de los 34 °C y se extiende hasta los 110 °C, representando un 9,12 % del peso total. La principal etapa de degradación térmica ocurre entre los 150 °C y los 450 °C, con una pérdida del 42,1 %, lo cual corresponde al proceso de descomposición de la estructura polimérica. Este rango de degradación es comparable al observado para las NPsCS sin metal. Las ligeras variaciones en la curva TGA de las NPsCS-Co se atribuyen a cambios en la morfología de las nanopartículas provocados por la incorporación del ion cobalto

Las NPsCS-Mo presentaron un comportamiento térmico muy similar al de las NPsCS, lo que sugiere que la baja concentración de molibdeno utilizada tiene un impacto casi nulo sobre su estabilidad térmica. La primera pérdida de peso ocurre entre los 30 y 100 °C, correspondiente a la evaporación de la humedad de la muestra, con una pérdida aproximada del 10 %. La segunda etapa corresponde a la degradación térmica del quitosán, que inicia alrededor de los 155 °C y se extiende hasta los 470 °C, con una pérdida de masa del 40 %.

Por otro lado, las NPsCS-Trip también muestran un comportamiento térmico similar al de las NPsCS. En este caso, se observa una pérdida del 9,2 % entre los 30 y 130 °C debido a la evaporación de agua. La incorporación simultánea de los tres micronutrientes (Ni, Co y Mo) no parece modificar significativamente el rango de degradación térmica, que se mantiene entre los 160 y 470 °C, con una pérdida de peso total del 42 %.

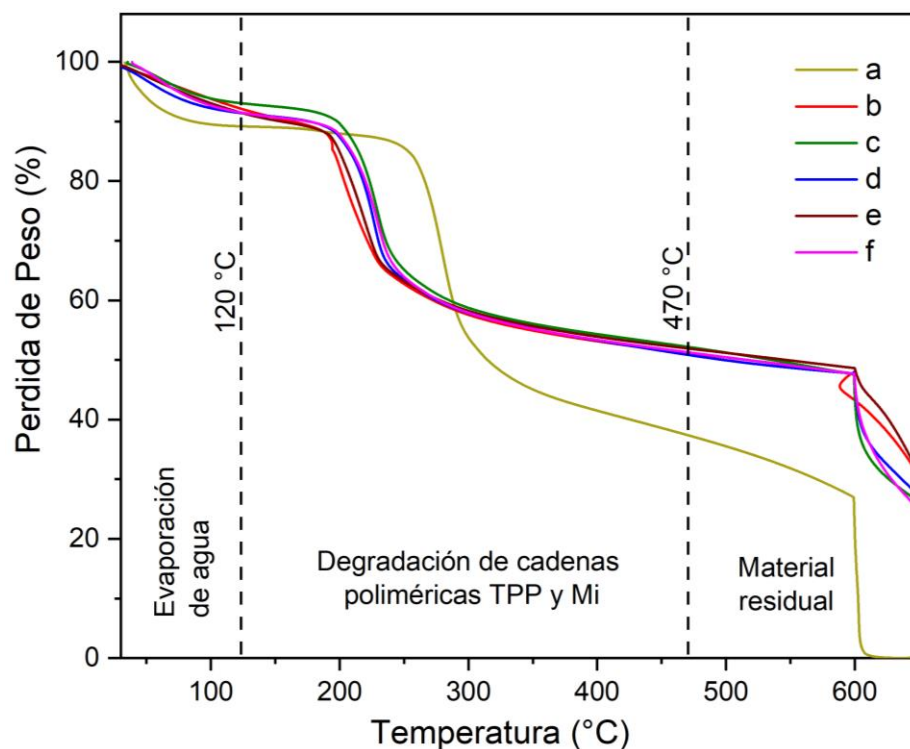


Figura 2. Termogramas de quitosán (a), nanopartículas de quitosán (b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Co (d), NPsCS-Mo (e) y NPsCS-Trip (f).

La variación en el porcentaje de agua presente en los compuestos está relacionada con las interacciones químicas generadas al añadir un agente reticulante y micronutrientes a las cadenas de quitosán, lo que influye en la capacidad de formar enlaces con las moléculas de agua (Abd El-Aziz et al., 2019).

A pesar de que las cantidades de micronutrientes utilizadas en la reacción triple (NPsCS-Trip) fueron las mismas que en las reacciones individuales, se observaron pequeñas diferencias en la degradación térmica. Esto podría deberse a una especie de 'competencia' entre los micronutrientes durante la síntesis, al intentar acomplejarse simultáneamente con las cadenas poliméricas del quitosán, lo que puede haber afectado la eficiencia del acoplamiento de cada uno de ellos y por lo tanto su tamaño de partícula.

Para un análisis más detallado del comportamiento térmico de las muestras, se elaboró la Figura 3, en la cual se observa un acercamiento en la zona de interés.

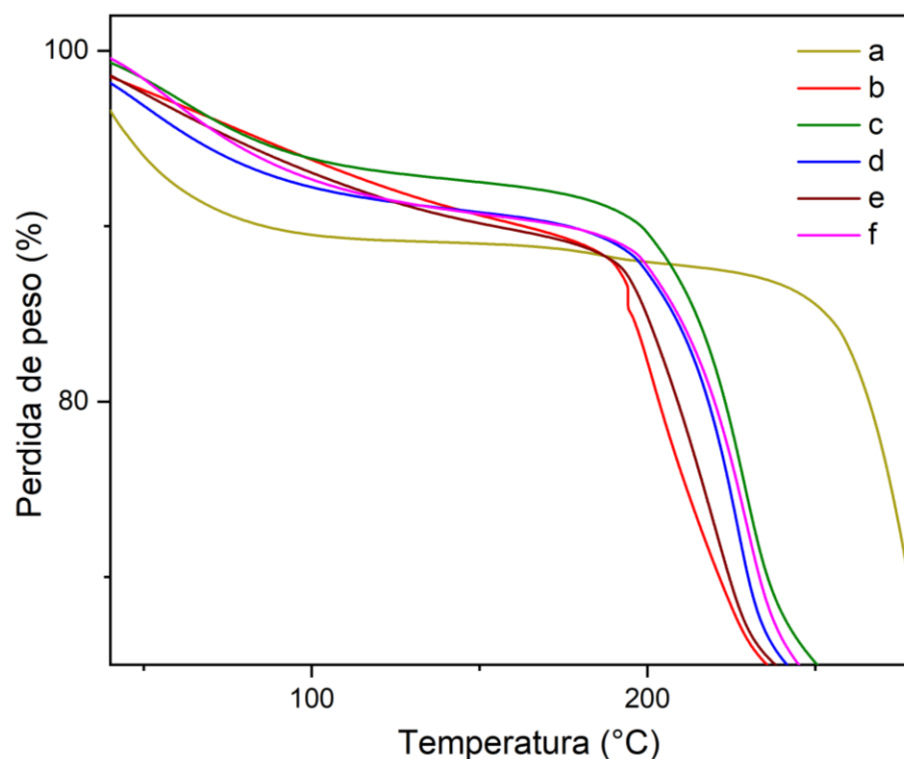


Figura 3. Termogramas amplificado de Quitosán (a), Nanopartículas de quitosán (b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Co (d), NPsCS-Mo (e) y NPsCS-Trip (f).

7.1.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El análisis térmico diferencial (Figura 4), permitió identificar los eventos endotérmicos y exotérmicos de CS, NPsCS y NPsCS-Mi, así como los cambios en entalpía (ΔH) asociados. En el CS se observaron dos picos principales: uno endotérmico entre 41.6 y 132 °C con temperatura máxima en 90.7 °C ($\Delta H = 215.93$ J/g), correspondiente a la pérdida de agua de grupos hidrofílicos; y un segundo pico exotérmico iniciado en 276 °C con temperatura máxima en 310 °C ($\Delta H = 107$ J/g), asociado a la degradación térmica de zonas parcialmente ordenadas del polímero (Dudhani & Kosaraju, 2010). Para el uso de las NPsCS, se registró un pico endotérmico más amplio (40.3–170 °C) con un mayor ΔH (303.13 J/g) y temperatura máxima en 88 °C, relacionado con la evaporación del agua (Abd El-Aziz *et al.*, 2019). Además, aparecieron dos picos exotérmicos a 217 °C ($\Delta H = 26.4$ J/g) y 247 °C, vinculados con la degradación de cadenas reticuladas y de mayor peso molecular, respectivamente (Ali *et al.*, 2011; Dudhani & Kosaraju, 2010).

Las NPsCS-Ni presentaron un primer pico endotérmico entre 50 y 175 °C con una temperatura máxima de 108 °C ($\Delta H = 356.86 \text{ J/g}$), indicando mayor higroscopicidad atribuida a la complejación con iones de Ni (Abd El-Aziz *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2011). También mostraron dos picos exotérmicos (211 y 230 °C), con una máxima degradación a 250 °C ($\Delta H = 81.16 \text{ J/g}$), reflejo de cambios estructurales en las cadenas poliméricas (Carrasco-Sandoval *et al.*, 2023; Santander-Ortega *et al.*, 2011).

En el caso de las NPsCS-Co, la evaporación del agua ocurrió entre 50 y 180 °C con un pico máximo a 102 °C ($\Delta H = 366.22 \text{ J/g}$). Se identificaron dos picos exotérmicos (218 y 230 °C), siendo el segundo más intenso (máx. 247 °C, $\Delta H = 88.93 \text{ J/g}$), lo que sugiere mayor presencia de cadenas ordenadas y de alto peso molecular tras la incorporación del Co (Alehosseini *et al.*, 2022; Cárdenas-Triviño *et al.*, 2017).

Las NPsCS-Mo mostraron un pico endotérmico entre 40 y 160 °C (máx. 98 °C, $\Delta H = 88.93 \text{ J/g}$), seguido de dos picos exotérmicos a 205 °C ($\Delta H = 16.1 \text{ J/g}$) y 244 °C ($\Delta H = 44.3 \text{ J/g}$). Estos eventos corresponden a la degradación de cadenas cortas y a la despolimerización inducida por la incorporación de Mo, confirmando su integración en la matriz (Ali *et al.*, 2011; Hadidi *et al.*, 2020).

Finalmente, las NPsCS-Trip mostraron evaporación de agua entre 50 y 180 °C (máx. 110 °C, $\Delta H = 342.21 \text{ J/g}$) y dos picos exotérmicos en 208 °C ($\Delta H = 5.14 \text{ J/g}$) y 247 °C ($\Delta H = 84.77 \text{ J/g}$), asociados a la degradación de cadenas reticuladas y de mayor peso, respectivamente, reforzando el efecto estructural de los micronutrientes añadidos (Carrasco-Sandoval *et al.*, 2023).

Aunque la temperatura de transición vítrea (T_g) no se identificó en los termogramas, estudios reportados indican que esta suele aparecer entre 210 y 230 °C (Merino *et al.*, 2016). Esta variabilidad se debe a la naturaleza del quitosán, cuya T_g depende de su fuente, peso molecular y grado de desacetilación (Guimarães *et al.*, 2020). La incorporación de iones metálicos también puede modificar la T_g , ya que estos afectan la movilidad de las cadenas poliméricas (Prokhorov *et al.*, 2015; González-Campos *et al.*, 2010), lo que explica posibles desplazamientos o dilución del pico correspondiente en las NPsCS-Mi.

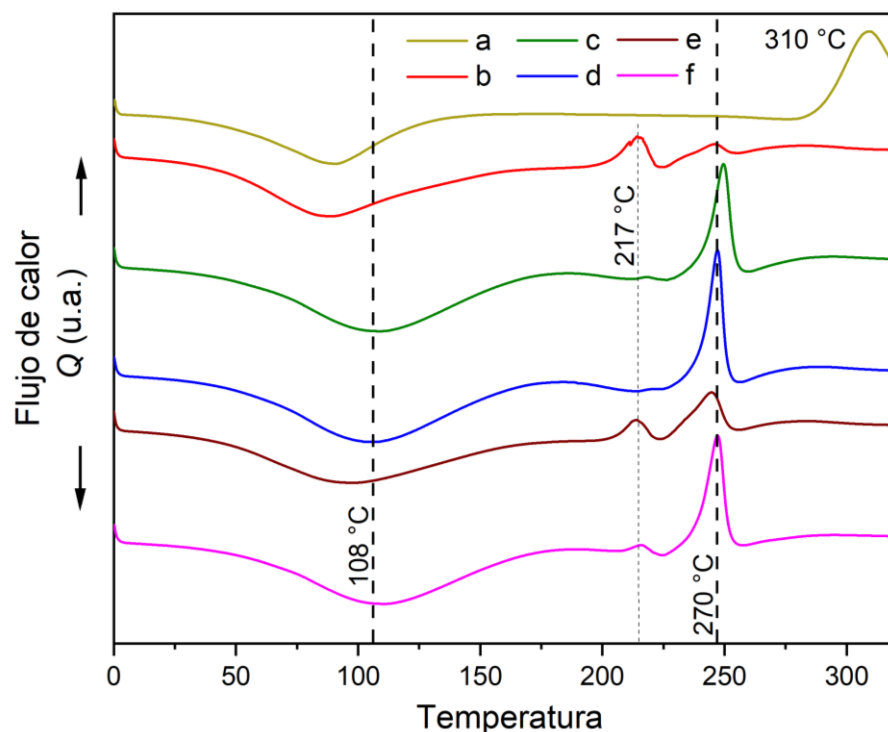


Figura 4. Termogramas de Quitosán (a), Nanopartículas de quitosán (b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Co (d), NPsCS-Mo (e) y NPsCS-Trip (f) por calorimetría diferencial de barrido.

Los gradientes de entalpías se presentan en la Tabla 3, se observa la variación para cada compuesto de acuerdo a su estabilidad térmica y ordenamiento, existiendo un mayor gradiente de entalpía en las regiones de mayor cristalinidad y una menor energía en aquellas zonas mayormente amorfas, esto está relacionado con una mayor liberación de calor o con la cantidad de energía que necesitan los complejos para modificarse térmicamente, este fenómeno se presenta para biopolímeros que pueden presentar una cristalización, una reacción química exotérmica, o un mecanismo de curado. En este caso, se observó un proceso de cristalización, ya que los micronutrientes dan pauta a un mayor ordenamiento de la fase cristalina del quitosán. Siento así que las NPsCS- Ni, NPsCS-Co y NPsCS-Trip mantienen un rango similar de cristalinidad y entalpía en comparación a las NPsCS-Mo en las que aumentan las regiones amorfas, decayendo el gradiente de entalpía, como se observa en la Figura 5 y Tabla3.

Tabla 3. Temperatura máxima y entalpia de degradación de quitosán, nanopartículas de quitosán y NPsCS-Mi mediante DSC.

Muestra	Endoterma		Exoterma I		Exoterma II	
	Tmáxima de degradación (°C)	Entalpia (J/g)	Tmáxima (°C)	Entalpía (J/g)	Tmáxima (°C)	Entalpía (J/g)
Agua	100	2260	-	-	-	-
CS	90	215.93	310	-	-	-
NPsCS	87.94	303.13	217	26.379	247	-
NPsCS-Ni	108.1	356.86	219	-	249	81.16
NPsCS-Co	102.15	366.22	221	-	247	88.93
NPsCS-Mo	96.48	295.9	213	16.105	245	44.13
NPsCS-Trip	110	342.21	216	5.14	247	84.77

7.1.6 Difracción de rayos X (DRX)

Para estudiar el efecto en la morfología y cristalinidad de la incorporación de micronutrientes (Ni, Co y Mo) en las cadenas poliméricas de las NPsCS, se realizaron estudios mediante DRX dentro del rango de 2θ de 5° – 90° . En la Figura 5 se muestra los difractogramas correspondientes al CS y NPsCS. El quitosán muestra tres principales picos en 2θ , a 11° , 20° , y 29° , los cuales corresponden a la forma cristalina tipo II que es característica de la estructura de quitosán (Samah et al., 2023). El pico en 2θ a 20° (110) está relacionado a la cristalinidad del material, mientras que el pico observado a 2θ a 11° (020) se atribuye a la red semicristalina del material (Ioelovich, 2014). El pico en 2θ a 29.2° (220) podría relacionarse a la presencia de cristallitos ordenados que se encuentran en una menor proporción. Por otra parte, se observan estructuras amorfas residuales en un rango de 35° a 50° en 2θ , las cuales se ha reportado su relación con el método de secado, el cual también influye en la cristalinidad del material (Malgorzata et al., 2003). El quitosán es capaz de formar regiones cristalinas con facilidad debido a la presencia de grupos amino ($-\text{NH}_2$) e hidroxilo ($-\text{OH}$) en sus cadenas poliméricas, los cuales tienden a formar fuertes enlaces de hidrógenos inter e intramoleculares con grupos funcionales afines (Kumar et al., 2016).

Para el caso de las NPsCS, el entrecruzamiento llevado a cabo tras la incorporación de TPP en las cadenas de CS modificó la estructura cristalina, generando cambios en la intensidad y ángulo de difracción de algunos de los picos observados en CS, presentando un ligero corrimiento a ángulos altos en el pico en 2θ a 13.2° (020) y un ligero corrimiento en 19.7° (110), conservando los mismos planos cristalinos. Ambos picos muestran una disminución en la intensidad de difracción, siendo especialmente notable en el pico ubicado en $2\theta = 19.7^\circ$ (110), cuya reducción es significativa. Esta disminución se atribuye a la deformación de las regiones cristalinas del quitosán, causada por el entrecruzamiento con moléculas de TPP. Dicho entrecruzamiento reorganiza los enlaces de hidrógeno originales del quitosán, sustituyéndolos por enlaces con los grupos funcionales (-OH) y (-NH₂) (Kumar et al., 2016). Como resultado, se forma una estructura reticulada o amorfa, la cual generalmente presenta una mayor densidad en comparación con el quitosán puro (Hemra Hamrayev & Kamyar Shameli, 2023). Este cambio en la cristalinidad de las cadenas poliméricas de CS promueve la formación de un nuevo pico en 2θ a 23.2° y un pequeño hombro o halomorfo adyacente al pico principal, lo que sugiere la presencia de una fase secundaria o una ligera reorganización estructural en las regiones semicristalinas del material (Sivakami et al., 2013).

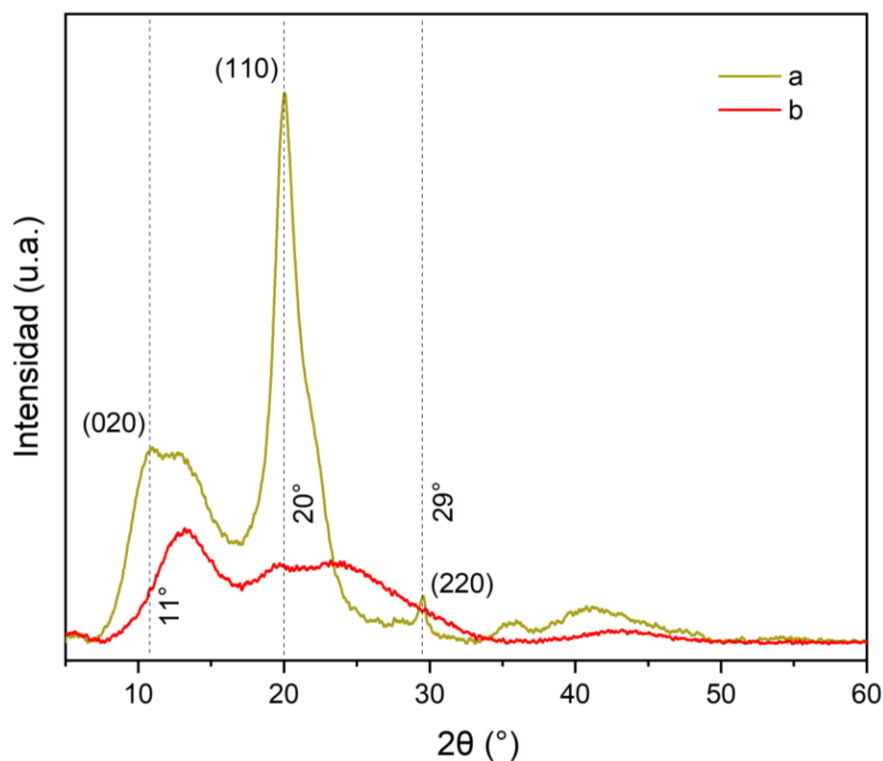


Figura 5. Difractograma de quitosán (a), nanopartículas de quitosán (b)

Para el caso de las NPsCS-Mi (Figura 6), se puede observar que todas las muestras presentan un pico amplio que va de 7.5° a 17.2° en 2θ y difractan en 2θ a 13.2° sin corrimientos en su máxima intensidad, lo que indica que el espacio interlaminar y el ordenamiento de la estructura semicristalina correspondiente a las cadenas poliméricas de las NPsCS no fue afectada. No obstante, la intensidad en el pico relacionado a la región de mayor cristalinidad en 2θ a 19.5° (110) y el pico derivado de la reticulación 23.2° en 2θ (120) varían su ángulo e intensidad de acuerdo a la muestra.

Las NPsCS-Co además de mostrar un pico intenso en 13.2° en 2θ , también presenta una disminución de intensidad en los picos 19.5° y 23.3° en 2θ en comparación con los observados en las NPsCS. Del mismo modo, el resto de las muestras presentan estos dos picos con ligeras alteraciones en sus ángulos e intensidad de difracción, siendo así que, para las NPsCS-Ni se presentan a 19.5° y 23.7° , para las NPsCS-Mo a 19.1° y 23.7° , y para las NPsCS-Trip se observan a 19.5° y 23.9° , respectivamente. Estas variaciones morfológicas están relacionadas con alteraciones causadas por la incorporación de los Mi sobre las cadenas poliméricas del CS, lo que evidencia la formación de los complejos. Además, es importante mencionar que el CS utilizado fue un CS de bajo peso molecular y baja cristalinidad, lo cual está relacionado con la afinidad, (Ioelovich, 2014; Piron & Accominott, 1998), capacidad quelante del material y con mayores áreas de interacción, por lo que, a menor cristalinidad, mejor absorción de minerales (Ioelovich, 2014; Piron & Accominott, 1998).

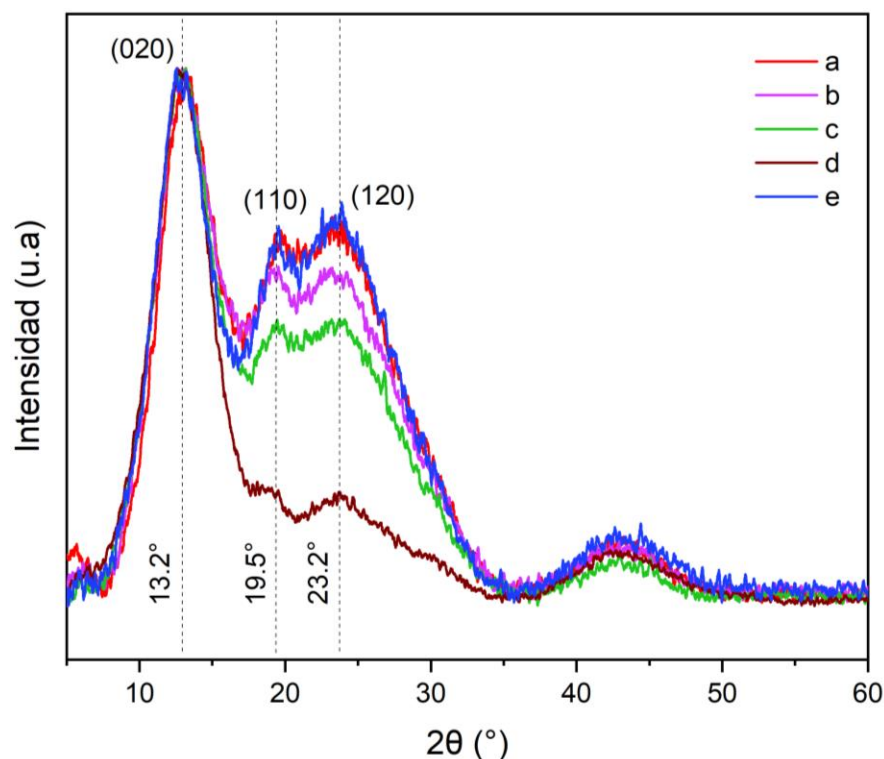


Figura 6. Difractograma de Nanopartículas de quitosán (a), NPsCS-Co b), NPsCS-Ni (c), NPsCS-Mo (d) y NPsCS-Trip (e)

La incorporación de micronutrientes en los complejos de NPsCS fomentaron el crecimiento de la zona cristalina o de mayor ordenamiento cristalino de las NPsCS debido a la posible sustitución de grupos (-OH) y (-NH₂) que provocó el reordenamiento de las cadenas poliméricas cristalinas. Además, se ha reportado que los iones metálicos pueden incorporarse en forma de patrones colgantes o en forma de puentes (X. Wang et al., 2004).

Los cambios observados en DRX evidencian los resultados de DSC, en donde se observó el incremento de intensidad del pico exotérmico en 270°C relacionado con el ordenamiento de las cadenas poliméricas que registraron un mayor gradiente de entalpía (ΔH).

7.2 Efecto de la aplicación de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi) sobre las propiedades morfológicas de las plántulas de melón

7.2.1 Porcentaje de germinación de semillas de melón tratadas con NPsCS-Mi

Evaluar el porcentaje de germinación permite determinar el efecto de los tratamientos y su influencia en el inicio del desarrollo vegetal. Conocer el índice es clave para lograr una siembra más uniforme y eficiente, lo que optimiza el uso del suelo, insumos y recursos.

Los ensayos realizados para evaluar el efecto de las NPsCS-Mi sobre el porcentaje de germinación de semillas de melón (Figura 7) muestran que, para el sistema de cultivo en taco (A) las NPsCS presentaron un mayor porcentaje de germinación (80%) con respecto al agua (71.1 %). Así mismo, las NPsCS-Ni fueron el tratamiento con mayor porcentaje de germinación (88.8 %) seguido de las NPsCS-Co y NPsCS-Mo que resultó en 84.4 % de germinación para ambos, superando aun así al blanco y las NPsCS. Por otro lado, las semillas tratadas con NPsCS-Trip presentan un bajo porcentaje de germinación (75.6 %) respecto al resto de los tratamientos de NPsCS-Mi.

Por otra parte, el sistema de cultivo en caja Petri (B) revela que las semillas tratadas con NPsCS tuvieron un porcentaje de germinación del 43.3 %, menor al del agua que fue del 60%. Las semillas tratadas con el tratamiento de NPsCS-Ni germinaron un 80 %, siendo más alto que las NPsCS-Mo y NPsCS-Trip que presentaron un porcentaje de germinación del 56.67 % y las semillas tratadas con las NPsCS-Co presentaron un porcentaje de germinación menor (43.3%). Para el sistema de cultivo en sustrato (C) se observa que el blanco presentó un 61.1 % de germinación, superior al porcentaje reportado para las NPsCS (55.5%). Los tratamientos con mayor respuesta a la germinación son las NPsCS-Co y NPsCS-Mo con un 77.7%, seguido de las NPsCS-Ni que presenta un porcentaje similar al del blanco con un (61.1%). Por otra parte, las NPsCS-Trip fue el tratamiento con menor respuesta a la germinación con un 44.4%.

En el caso de la aplicación por aspersión, no se evaluó el porcentaje de germinación dado que el tratamiento se aplicó posterior a la germinación (sobre plántulas de 15 días de crecimiento) por lo que no hubo algún efecto de los tratamientos sobre esta variable.

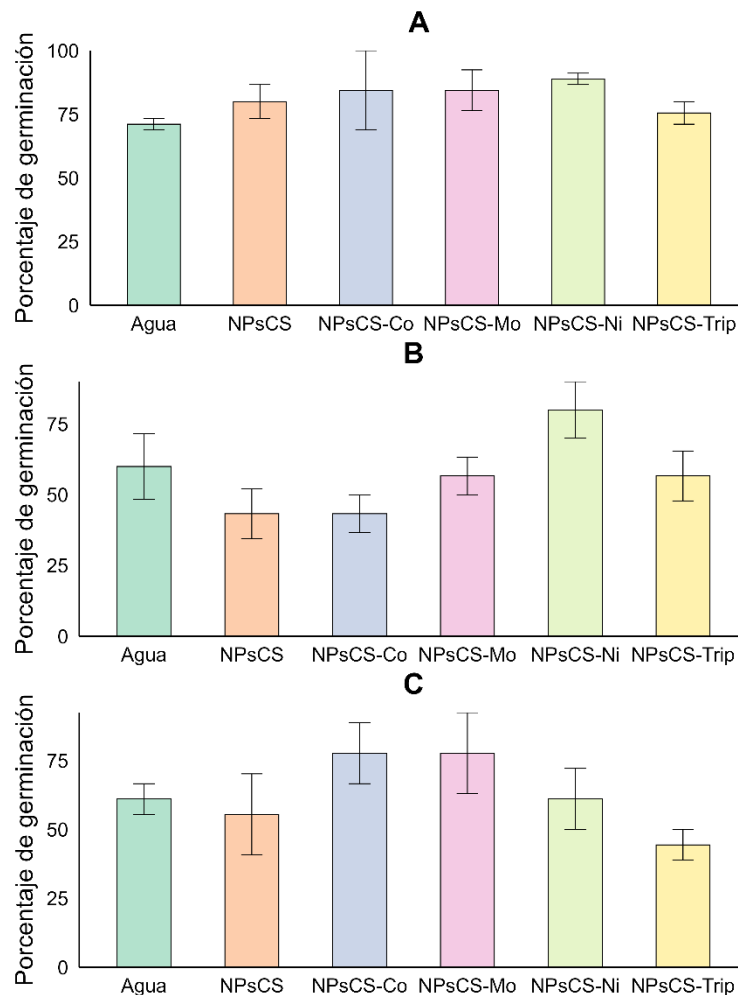


Figura 7. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre la germinación de semillas de melón en los diferentes sistemas de cultivo: taco (A), caja Petri (B), sustrato (C), por aspersión (D). Los datos son la media $\pm$ desviación estándar. *=diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

En el sistema de taco, se observó un incremento general en la tasa de germinación tanto con NPsCS como con NPsCS-Mi, en comparación con el tratamiento control (agua). Este comportamiento puede atribuirse a las propiedades del quitosán, como su capacidad para retener humedad y modular respuestas fisiológicas en las semillas (Katiyar et al., 2015). La incorporación de micronutrientes aumentó ligeramente este efecto, aunque sólo se observó de manera significativa al aplicarse las NPsCS-Ni. Cabe mencionar que el sistema de taco ofrece condiciones favorables para la germinación, tales como mayor retención de humedad, menor

exposición directa a la luz y contacto más cercano de las semillas con el agente aplicado, lo cual pudo haber favorecido la absorción y efecto de las nanopartículas.

Sin embargo, estos efectos positivos no se replicaron en el sistema de caja, donde se observó una reducción en la germinación cuando se imbibieron en las NPsCS y una reducción mayor con la mayoría de las NPsCS-Mi. Este comportamiento puede relacionarse a una posible acumulación o mala distribución de las nanopartículas, cercanas a límites tóxicos. Además, esta inhibición también podría estar relacionada con una posible intoxicación causada por la liberación rápida y directa de los micronutrientes debido a la baja capacidad de amortiguación del papel filtro, sumado a una mayor exposición a la luz. No obstante, el tratamiento con NPsCS-Ni, mostró una mejora respecto al blanco.

En el sistema de sustrato (perlita + peat moss) también se presentó un comportamiento heterogéneo y poco correlacionado con los otros dos métodos. Los tratamientos con NPsCS-Co y NPsCS-Mo mostraron una mejora en la germinación, mientras que las NPsCS-Ni mostraron un comportamiento similar al blanco. Contrariamente el tratamiento con NPsCS-Trip resultó desfavorable o incluso inhibió la germinación. Lo cual sugiere que posiblemente la interacción de las NPs y minerales con las semillas se modificaron debido al sustrato, que actúa como una matriz adsorbente, afectando la biodisponibilidad de las nanopartículas, su movilidad o la tasa de liberación de los micronutrientes (Saberri Riseh et al., 2024; Shrivastava et al., 2019). Esto, sumado a una menor retención de humedad respecto al taco y a una exposición parcial a la luz, podría haber afectado la actividad metabólica de las semillas (Farooq et al., 2022; Li et al., 2019). Las NPsCS-Ni, en particular, parecen mantener un equilibrio adecuado entre disponibilidad y acción sin inducir efectos negativos, al menos en los métodos de germinación evaluados.

El tratamiento con las NPsCS-Trip mostró un efecto desfavorable en todos los métodos de germinación, lo cual sugiere una posible sinergia negativa entre los tres metales incorporados, ya sea por sobreacumulación o por interferencia en procesos fisiológicos sensibles de la germinación. Aunque no se puede confirmar sin análisis específicos, la literatura sugiere que la combinación de varios metales puede generar un estrés excesivo en tejidos embrionarios si no se liberan en proporciones adecuadas (Shahid, 2021).

En conjunto, los resultados sugieren que la respuesta a la aplicación de las NPsCS-Mi depende no sólo de su composición, sino también de las condiciones físicas en las que se aplican. Factores

como la retención de humedad, la exposición a la luz, la interacción con matrices sólidas y la tasa de liberación de los micronutrientes son parámetros clave.

La evaluación del índice de germinación por los métodos de taco, caja y sustrato mostró notables variaciones en la respuesta de las semillas tratadas con nanopartículas de quitosán (NPsCS) y con nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi). Estas diferencias pueden deberse por la interacción de múltiples factores físicos y químicos asociados al método de germinación, así como al tipo de nanopartícula utilizada (Allam et al., 2024; Farooq et al., 2022).

7.2.2 Comportamiento del crecimiento radicular y aéreo en plántulas de melón por la aplicación de NPsCS-Mi

Al medir la longitud de la raíz y el tallo nos permite evaluar el vigor y el desarrollo inicial de las plántulas, aspectos fundamentales para el establecimiento de un cultivo (Bellaloui & Kassem, 2021; Di Benedetto & Tognetti, 2016). La longitud de la raíz indica la capacidad para absorber agua y nutrientes, mientras que el desarrollo del tallo muestra el vigor en la plántula, su capacidad fotosintética y el potencial para un desarrollo sano y productivo.

En la Figura 8 se muestra que para el sistema de cultivo en taco (A), el tratamiento con agua (blanco) presentó la mayor longitud del tallo, con un promedio de 8.5 cm, seguido por las NPsCS con 8.2 cm, las NPsCS-Ni con 8.1 cm, NPsCS-Trip con 7.8 cm, NPsCS-Mo 7.5 cm y NPsCS-Co con 7.3 cm, siendo este último el tratamiento que muestra menor longitud de tallo. Sin embargo, el crecimiento radicular presentó diferencias con los tratamientos con NPsCS-Mi. El blanco mostró el menor tamaño de raíz (11.4 cm), mientras que las NPsCS con 12.8 cm son un 15 % mayores. Las NPsCS-Ni y NPsCS-Co presentaron mayores longitudes con 14.6 cm y 13.9 cm, respectivamente, o sea más largas en un 24 % y 31 %. Asimismo, las NPsCS-Mo y NPsCS-Trip también superaron al blanco, con longitudes de 13.5 cm y 12.4 cm, respectivamente, pero no presentan efectos significativos.

En el sistema de cultivo en caja (B), la longitud mayor del tallo se observó en el blanco con 2.6 cm, mientras que las plántulas tratadas con NPsCS tuvieron una longitud de 2.0 cm. El tratamiento con NPsCS-Co mostró un crecimiento ligeramente superior con 2.2 cm, seguido de los tratamientos con NPsCS-Mo y NPsCS-Trip, ambos con 2.1 cm. Por su parte, las plántulas tratadas con NPsCS-Ni mostraron la menor longitud de tallo, con apenas 1.5 cm. Por otra parte,

en el crecimiento radicular se observaron mayores longitudes en comparación con el tallo. El tratamiento con NPsCS registró la mayor elongación promedio de la radícula, con 11.6 cm, superando al blanco, que presentó 8.4 cm. Respecto a la longitud de la raíz las NPsCS-Mo, NPsCS-Ni y NPsCS-Trip mostraron resultados similares entre sí y comparables al blanco, 8.4 cm, 5.3 cm y 5.1 cm, respectivamente. En contraste, el tratamiento con NPsCS-Co fue el menos efectivo con apenas 2.2 cm, lo que representa una disminución significativa respecto al blanco.

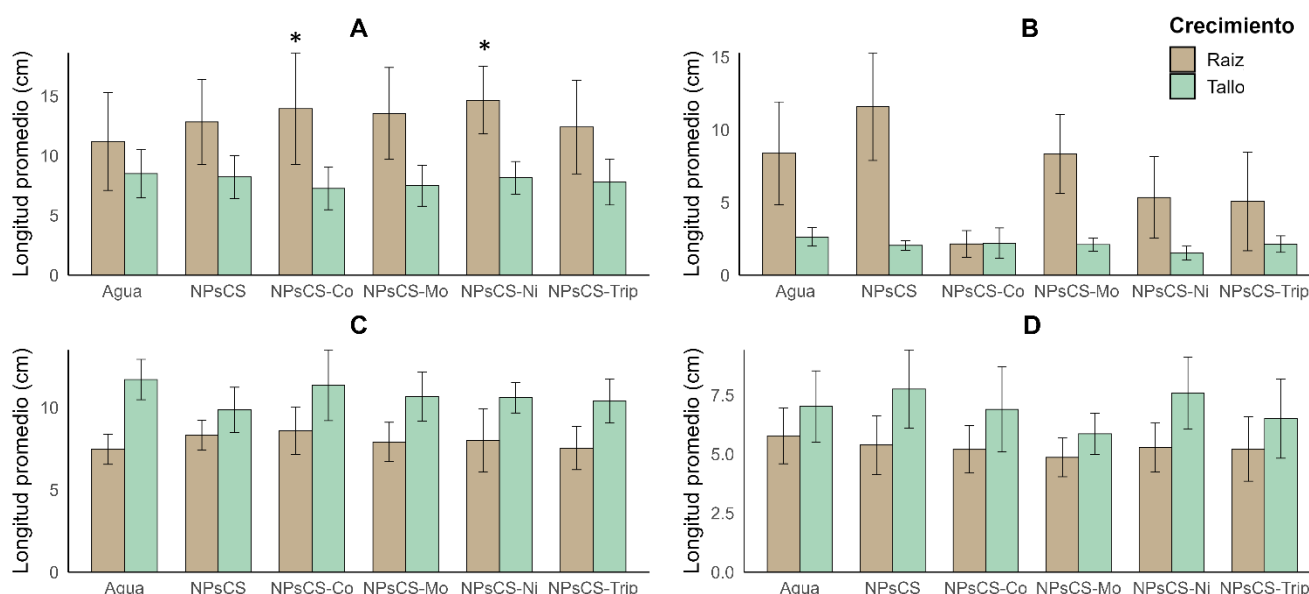


Figura 8. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre el crecimiento radicular y aéreo en plántulas de melón en los diferentes sistemas de cultivo: taco (A), caja Petri (B), sustrato (C), por aspersión (D). Los datos son la media $\pm$ desviación estándar. *=indica diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.05$)

Por su parte, en el sistema de cultivo con sustrato (C) se observó una mayor longitud de los tallos que de las raíces. Donde la mayor longitud del tallo se observó en el blanco (agua), alcanzando 11.6 cm, mientras que las plántulas tratadas con NPsCS presentaron una longitud de 9.8 cm. El tratamiento con NPsCS-Co mostró una media de 11.4 cm, seguido de las NPsCS-Mo, NPsCS-Ni, ambos con un promedio de 10.6 cm y las NPsCS-Trip mostraron una menor longitud del tallo, con 10.4 cm en promedio.

En cuanto al crecimiento radicular, el tratamiento con NPsCS fué de 8.3 cm, superando al blanco, que alcanzó 7.5 cm. Las plántulas tratadas con NPsCS-Co presentaron un alargamiento ligeramente superior que el resto de los tratamientos con 8.6 cm, mientras con NPsCS-Mo, NPsCS-Ni y NPsCS-Trip mostraron resultados similares entre sí, con medias de 7.9 cm, 8.0 cm y 7.5 cm, respectivamente. En general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para la longitud de raíz o tallo.

Aunque el mecanismo específico de interacción del CS y las NPsCS en la célula vegetal con respecto al crecimiento aún no está bien definido (Khalifa, 2018), es sabido que su aplicación puede promover el crecimiento de órganos vegetales. Así mismo, en bajas concentraciones (<40 ppm) se relaciona con procesos de división y crecimiento celular. También se propone que, gracias a sus cualidades higroscópicas modula el flujo de agua y modifica la presión osmótica, favoreciendo la movilización de nutrientes y disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chamnanmanoontham et al., 2015). Contrariamente, la aplicación de NPsCS en altas concentraciones puede causar severos daños en la célula. En diversos cultivos, concentraciones mayores al 10 % p/v pueden provocar inhibición del crecimiento, reduciendo el tamaño de las raíces y los tallos. Esto se debe a que posiblemente se genera daño al embrión por citotoxicidad a altas concentraciones, reduciendo la actividad enzimática e incluso se han observado efectos genotóxicos por altas concentraciones o largo tiempo de exposición (mayor a 12 h en imbibición) (Allam et al., 2024; Khalifa, 2018).

Sin embargo, en la mayoría de los tratamientos no se observan diferencias significativas con respecto al blanco, siendo resultados con poca variabilidad, lo cual puede atribuirse a la corta duración del experimento (15 días). Geisler-Lee y colaboradores (2014) y Rodríguez y colaboradores (2019) mencionan que algunos efectos morfológicos o bioquímicos tardan en expresarse y no son visibles en ensayos de tiempo corto, puesto que suelen requerir mayor tiempo de observación e incluso llegar a la madurez. La variabilidad genética entre los individuos puede modificar la respuesta, aumentando la desviación de los datos, que produce datos inconsistentes o con poca diferencia entre los tratamientos (Bell *et al.*, 2013).

Al igual que en la germinación, se nota diferente la respuesta a los tratamientos en el sistema de cultivo en caja, esto se atribuye a las condiciones exógenas que pudieron modificar la interacción de las NPsCS-Mi, debido a la humedad y exposición a la luz. Como ya se mencionó,

estos factores pueden modificar la interacción y liberación de las NPs (Szymańska & Winnicka, 2015b), provocando en este caso un efecto adverso.

7.2.3 Cambios en biomasa y humedad en plántulas de melón por la aplicación de NPsCS-Mi

La biomasa refleja el crecimiento total de la planta y su capacidad para acumular materia seca, lo cual es un indicador del rendimiento y la eficiencia en el uso de recursos como agua, luz y nutrientes (Di Benedetto & Tognetti, 2016). Como se muestra en la Tabla 4 los resultados de biomasa seca y el porcentaje de humedad de las plántulas no se encontró alguna diferencia significativa entre los tratamientos en cada sistema de cultivo y aplicación. Sólo es posible observar en el sistema de taco que el blanco presenta una biomasa más alta que el resto de los tratamientos y un porcentaje de humedad menor. El sistema de cultivo en caja Petri, las muestras presentaron signos de deterioro y contaminación microbiana, impidiendo su evaluación.

Tabla 4. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi en la biomasa y humedad en plántulas de melón Cantaloupe variedad Sweet Sunrise

Sistema	Taco		Sustrato		Aspersión	
Tratamiento	Biomasa (g)	Humedad (%)	Biomasa (g)	Humedad (%)	Biomasa (g)	Humedad (%)
Agua	0.097±0.01	86±13.7	0.019 ±0.006	93.3 ±0.8	0.09 ±0.05	91.8 ±0.8
NPsCS	0.043±0.007	94.3±0.3	0.021 ±0.003	92 ±3.2	0.068 ±0.01	92.3 ±1.5
NPsCS-Ni	0.053±0.007	95.4±1.3	0.018 ±0.003	93.9 ±2.3	0.073 ±0.01	94.9 ±0.4
NPsCS-Co	0.053±0.01	94.9±0.6	0.023 ±0.005	94 ±0.9	0.072 ±0.001	93.9 ±0.01
NPsCS-Mo	0.08±0.04	92.8±4.3	0.018 ±0.006	93.2 ±0.7	0.055 ±0.02	92 ±5.4

NPsCS-Trip	0.045±0.02	95.1±0.15	0.02 ±0.004	94.6 ±0.03	0.046 ±0.008	95.1 ±1.45
------------	------------	-----------	----------------	------------	-----------------	------------

Los datos de biomasa representan el peso seco de las plántulas. Los datos están ordenados por sistema de cultivo/ aplicación y tratamiento y son la media ± desviación estándar. *=indica diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.05$)

La disminución en la biomasa está directamente relacionada con su actividad y capacidad fotosintética. Esto se explica mediante la biomasa-fuente (source-sink), en la cual la fuente es la encargada de la síntesis de carbohidratos y energía, necesarios para la formación de biomasa. Los productos generados por la fuente son utilizados y almacenados en los tejidos de mayor necesidad, dependiendo de las necesidades fisiológicas de la planta, por lo que se puede acumular mayormente en tallos durante las etapas iniciales de desarrollo, actuando como un sitio prioritario ya que es clave para sostener la parte aérea y preparar el sistema fotosintético (Paul & Foyer, 2001).

7.3 Propiedades bioquímicas de las plántulas de melón por la aplicación de las nanopartículas de quitosán con micronutrientes (NPsCS-Mi)

7.3.1 Clorofila a y b en plántulas de melón tratadas con NPsCS-Mi

El contenido de clorofila permite evaluar de forma indirecta el estado nutricional y fisiológico de las plantas, que se relaciona con la capacidad fotosintética y el vigor general del tejido foliar (Taiz & Zenger, 2006). Los ensayos realizados para evaluar el efecto de las NPsCS-Mi sobre el contenido de clorofila en plántulas de melón (Figura 9) muestran que, para el sistema de cultivo en taco (A) el blanco presentó las mayores concentraciones de clorofila a y clorofila b, con valores de 6.1 $\mu\text{g/g}$ y 5.2 $\mu\text{g/g}$ de tejido, respectivamente. En contraste, NPsCS redujeron el contenido de clorofilas hasta 4.3 $\mu\text{g/g}$ para la clorofila a y 4.6 $\mu\text{g/g}$ para la clorofila b. Las NPsCS-Ni mostraron 5.2 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y 4.6 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b. Por otro lado, los compuestos con cobalto y molibdeno (NPsCS-Co y NPsCS-Mo) registraron niveles más bajos en comparación con el blanco y las NPsCS. Las NPsCS-Co alcanzaron 3.0 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y 3.9 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b, mientras que las NPsCS-Mo presentaron 4.6 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y

2.6 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b. Por último, el tratamiento con las NPsCS-Trip, redujo significativamente el contenido de clorofila a hasta 1.15 $\mu\text{g/g}$ y para clorofila b en 1.8 $\mu\text{g/g}$.

La aplicación de NPsCS a altas concentraciones puede generar efectos adversos en los tejidos vegetales, como toxicidad, ROS e incluso efectos genotóxicos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son altamente dañinas en la célula, ya que puede afectar las membranas celulares, incluidas las membranas de los cloroplastos, dañando su contenido (Aziz, A., 2019). Por su parte, en el sistema de cultivo en caja Petri (B) las semillas del blanco presentaron 4.4 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y 3.8 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b, valores similares a los observados en las semillas tratadas con NPsCS, que alcanzaron 4.6 $\mu\text{g/g}$ y 2.6 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y b, respectivamente. A su vez, las NPsCS-Ni, con 6.4 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y 4.7 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b, mientras que las NPsCS-Mo presentaron valores más bajos con 5.2 $\mu\text{g/g}$ para clorofila a y 4.8 $\mu\text{g/g}$ para clorofila b. No se presentan datos del tratamiento con NPsCS-Co debido a la pérdida de la muestra correspondiente. En cambio, el tratamiento con NPsCS-Trip registró el mayor contenido de clorofilas entre todos los tratamientos, con 13.0 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y 12.6 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b. Como se observa, la aplicación de nanocompuestos de CS disminuye la cantidad de pigmentos fotosintéticos (clorofila a y b), reduciendo así la actividad fotosintética, la cual disminuyó la formación de biomasa, como se mostró en el apartado anterior.

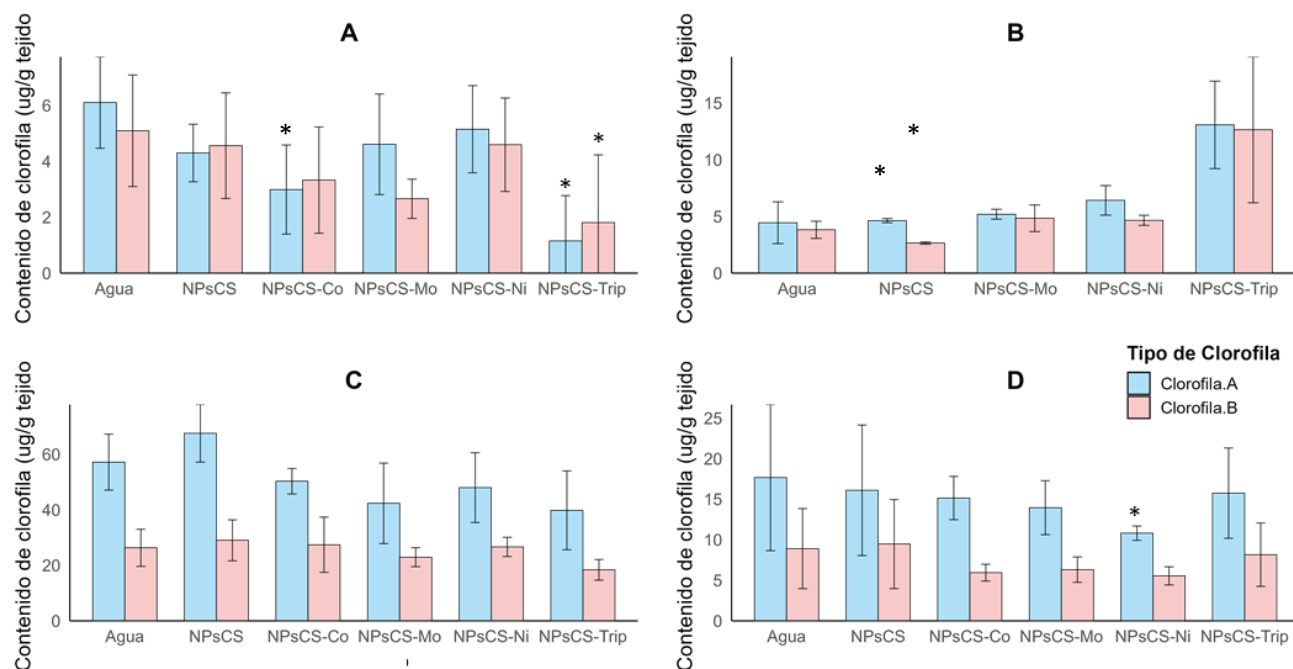


Figura 9. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre el contenido de clorofila a y b (en $\mu\text{g/g}$ tejido) en plántulas de melón en diferentes sistemas de cultivo: taco (A), caja Petri (B), sustrato

(C), por aspersión (D). *Los datos son la media $\pm$ desviación estándar. *=indica diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

En el sistema de cultivo en sustrato (C) el blanco generó una respuesta comparable a la de los tratamientos con NPsCS-Mi, con un promedio de 57.2 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y 26.3 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b. Por su parte, las NPsCS demostraron un efecto más favorable en la síntesis de clorofilas, alcanzando 67.5 $\mu\text{g/g}$ de clorofila A y 29.0 $\mu\text{g/g}$ de clorofila B. El resto de los tratamientos presentaron efectos similares entre sí, con valores de 50.3 $\mu\text{g/g}$ y 27.4 $\mu\text{g/g}$ para NPsCS-Co, 48.0 $\mu\text{g/g}$ y 26.6 $\mu\text{g/g}$ para NPsCS-Ni, y 42.3 $\mu\text{g/g}$ y 22.9 $\mu\text{g/g}$ para NPsCS-Mo, respectivamente. Las NPsCS-Trip fueron el tratamiento con menor respuesta al contenido de clorofilas, registrando 39.8 $\mu\text{g/g}$ de clorofila A y 18.4 $\mu\text{g/g}$ de clorofila B.

Las plántulas aplicadas con NPsCS-Mi a través del método de aspersión (D) mostraron una mayor síntesis de clorofilas en el blanco (agua), alcanzando un promedio de 17.9 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y 8.9 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b. El tratamiento con NPsCS presentó valores similares, con 16.1 $\mu\text{g/g}$ de clorofila a y 9.4 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b. En cuanto al resto de los tratamientos, se observaron producciones de 15.7 $\mu\text{g/g}$ y 8.1 $\mu\text{g/g}$ para NPsCS-Trip, 15.2 $\mu\text{g/g}$ y 5.9 $\mu\text{g/g}$ para NPsCS-Co, y 14.0 $\mu\text{g/g}$ y 6.3 $\mu\text{g/g}$ para NPsCS-Mo, respectivamente. El tratamiento con mayor impacto fue el de NPsCS-Ni, que redujo significativamente el contenido de clorofila a hasta 10.8 $\mu\text{g/g}$ y 5.5 $\mu\text{g/g}$ de clorofila b.

Para el caso de las NPsCS-Mo, se atribuye que el Mo estabilizó la cantidad de pigmentos en la célula gracias a una posible estimulación de la nitrato reductasa, enzima encargada de la asimilación de nitrógeno, elemento necesario en la síntesis de proteínas y clorofilas (Yu et al., 1999; Z. Y. Wang et al., 1999). El resto de los micronutrientes no se relacionan a algún proceso favorable en la síntesis de pigmentos, sin embargo, una alta concentración podría aumentar los niveles de estrés, alterando las rutas metabólicas y la formación de ROS (Akeel & Jahan, 2020; Hao et al., 2016; Shahid, 2021).

7.3.2 Contenido de fenoles totales en tallos de plántulas de melón tratados con NPsCS-Mi

El contenido promedio de fenoles totales en las plántulas de melón se presenta en la Figura 10, en la que varían los rangos del contenido de fenoles según el sistema de cultivo.

Para el sistema de cultivo en taco (A) el rango de contenido va de 212 a 312 $\mu\text{gEq/g}$ de fenoles totales por gramo de tejido fresco ($\mu\text{gEq/g}$). Para el blanco se registraron un promedio de 212.4 $\mu\text{gEq/g}$, mientras que para el tratamiento con NPsCS fue de 275 $\mu\text{gEq/g}$ de FT, mostrando un incremento del (29.5) tras su aplicación. Las NPsCS-Mi también manifestaron un ligero aumento en la síntesis de FT en comparación al blanco, incrementando un 46.8 % tras la aplicación de NPsCS-Mo (311.9 $\mu\text{gEq/g}$), un 29.1% con las NPsCS-Ni (265.3 $\mu\text{gEq/g}$), 12.5 % con las NPsCS-Trip (238.8 $\mu\text{gEq/g}$) y apenas un 7.1 % con las NPsCS-Co (227.5 $\mu\text{gEq/g}$). Siendo las NPsCS-Mo el único tratamiento estadísticamente diferente al blanco.

Los resultados observados en el sistema de cultivo en taco sugieren que la actividad de las NPsCS como elicitador está relacionada con las condiciones de luz y humedad, para poder estimular la respuesta al estrés. Por lo que, condiciones óptimas de humedad pudieron mejorar la liberación de NPsCS y los micronutrientes (Szymańska & Winnicka, 2015b), sin rebasar los niveles tolerables de la planta, permitiendo su neutralización. Sin embargo, un bajo nivel de humedad reduce el grado de hinchamiento de las NPsCS, modificando su tasa de liberación (Kashyap et al., 2015).

La cantidad de fenoles totales registrada en los tratamientos desarrollados en el sistema de caja (B) mostraron una disminución en la mayoría de los tratamientos con respecto al blanco que presentó un promedio de 557.3 $\mu\text{gEq/g}$ mientras que el tratamiento de NPsCS se redujo hasta 216.5 $\mu\text{gEq/g}$. Por su parte, las NPsCS-Mo y NPsCS-Ni también disminuyeron la síntesis de FT hasta 286.7 y 229.8 $\mu\text{gEq/g}$, respectivamente. En contraste el tratamiento con NPsCS-Trip logro aumentar la cantidad de FT mostrando una media de 887.6 $\mu\text{gEq/g}$, aunque no representa una diferencia significativa asociada a su grado de desviación.

Para el sistema de cultivo en sustrato (C) el blanco presentó mejor respuesta al estrés oxidativo con 3,010.7 $\mu\text{gEq/g}$. Contrariamente, el resto de los tratamientos mostraron una disminución en la cantidad de FT, donde el tratamiento con NPsCS presentó 2,111.1 $\mu\text{gEq/g}$ mientras que las NPsCS-Co, NPsCS-Mo, NPsCS-Ni y NPsCS-Trip redujeron sus valores hasta 2394.5, 1829.4, 1728.1 y 2018.1 $\mu\text{gEq/g}$. Aunque no se comprueba una diferencia significativa entre los tratamientos, se logra apreciar un cambio aparente tras la aplicación de NPsCS y NPsCS-Mi. Es así que, la respuesta observada en los sistemas de cultivo en caja y en sustrato pudo estar relacionada a que posiblemente no se logró proveer de condiciones adecuadas para la liberación

de las NPsCS concentrándose en altos niveles, causando estrés excesivo en la planta, superando la tolerancia e inhibiendo la síntesis de metabolitos.

Por su parte, el sistema por aspersión (D) muestra que el blanco presentó una menor respuesta al estrés oxidativo según su contenido de FT (152 $\mu\text{gEq/g}$) respecto a las NPsCS con 205.3 $\mu\text{gEq/g}$ (35 % mayor producción). Así mismo, el resto de los tratamientos también presentan un ligero aumento en los fenoles totales, siendo las NPsCS-Ni el tratamiento estadísticamente más efectivo con 295 $\mu\text{gEq/g}$ (94 % más). De igual forma, los tratamientos con NPsCS-Co, NPsCS-Mo y NPsCS-Trip superan al blanco con 186.3 $\mu\text{gEq/g}$ (22% más), 186.8 $\mu\text{gEq/g}$ (23% más) y 203.5 $\mu\text{gEq/g}$ (34 % más), respectivamente.

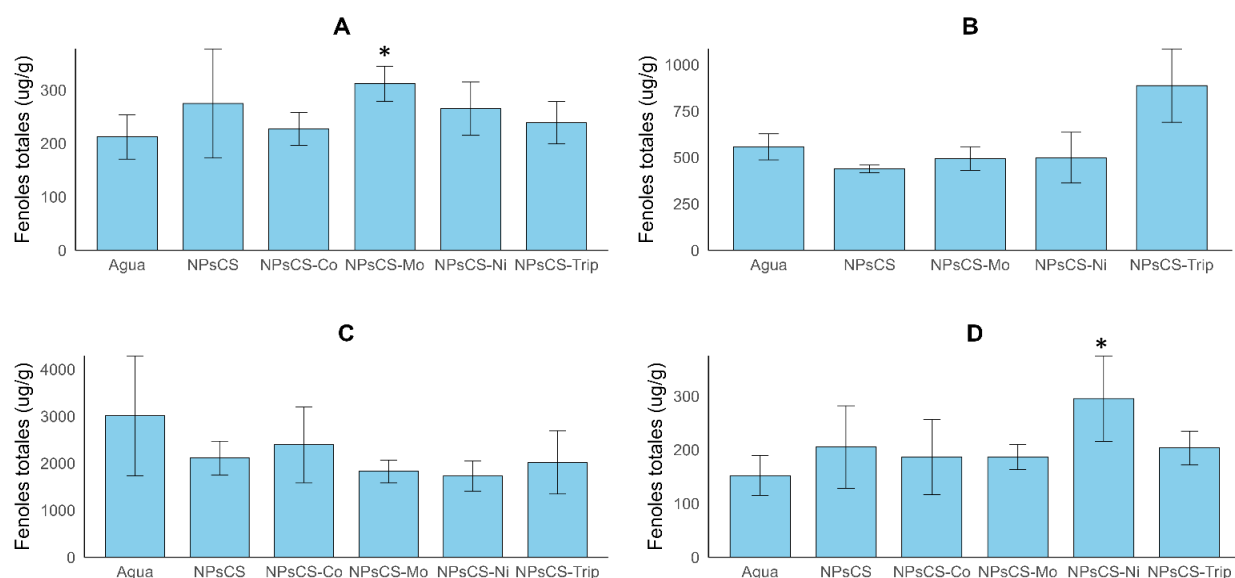


Figura 10. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre el contenido de fenoles totales en tallos de plántulas de melón en los diferentes sistemas de cultivo: taco (A), caja Petri (B), sustrato (C), aspersión (D). Los datos se expresan en equivalentes de ácido gálico y son la media $\pm$ desviación estándar. *=indica diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.05$)

Un aumento en la concentración de fenoles podría ser un parámetro para determinar si la planta fue sometida a estrés, así como su respuesta ante estas condiciones.

La aplicación foliar mostro resultados similares entre los tratamientos atribuibles al CS y a las condiciones de cultivo (Guo et al., 2024). Sin embargo, los tratamientos con NPsCS-Mi muestran una disminución en la cantidad de fenoles en comparación al CS para la mayoría de

los sistemas de cultivo. Sugiriendo que la adición de metales aumenta el estrés que, sumado a las condiciones poco favorables para la liberación de las NPs, resulto en una disminución de fenoles totales por posible inhibición de las rutas de síntesis, desviando recursos hacia la protección celular y el metabolismo basal (Piasecka et al., 2015).

7.3.3 Capacidad antioxidante de los tallos en plántulas de melón tratadas con NPsCS-Mi

Los resultados promedio de la capacidad antioxidante de los tallos en plántulas de melón en los diferentes sistemas, se muestran en la Figura 11.

La capacidad antioxidante medida en los tratamientos desarrollados en el sistema de cultivo en taco (A) muestra un incremento tras la aplicación de NPsCS y NPsCS-Mi en comparación con el blanco. La capacidad antioxidante en el blanco es de 20.6 $\mu\text{gEq/g}$, mientras que para el tratamiento con NPsCS es de 59.5 $\mu\text{gEq/g}$. Así mismo las NPsCS-Ni, NPsCS-Mo y NPsCS-Trip incrementan aún más la capacidad antioxidante de las plántulas alcanzando hasta 95, 71.2 y 70.6 $\mu\text{gEq/g}$, respectivamente, siendo estadísticamente diferentes al blanco. En contraste, las NPsCS-Co incrementan la capacidad antioxidante hasta 46 $\mu\text{gEq/g}$, aunque no muestran una diferencia significativa.

En el sistema de cultivo en caja (B), se observó una disminución en la capacidad antioxidante tras la aplicación de NPsCS y NPsCS-Mi, aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa en comparación con el blanco. El valor de equivalentes del tratamiento con agua fue de 328.9 $\mu\text{gEq/g}$, mientras que para las plántulas tratadas con NPsCS fue de 216.5 $\mu\text{gEq/g}$. De igual forma, la aplicación de NPsCS-Mi afectó la capacidad antioxidante en los tratamientos con NPsCS-Mo, NPsCS-Ni y NPsCS-Trip fue de 286.7, 229.8 y 213.8 $\mu\text{gEq/g}$, respectivamente. No se reportan datos de la capacidad antioxidante del tratamiento con NPsCS-Co por falta de muestra.

Para el sistema de cultivo en sustrato (C) el blanco presentó un valor de 156.9 $\mu\text{gEq/g}$, inferior al registrado en las plántulas tratadas con NPsCS, que mostraron una media de 220.7 $\mu\text{gEq/g}$ y las NPsCS-Co reflejaron un valor aproximado de 183.8 $\mu\text{gEq/g}$. En contraste, los tratamientos con NPsCS-Mo, NPsCS-Ni y NPsCS-Trip mostraron una reducción en la capacidad antioxidante, con 136.2, 77.3 y 72.8 $\mu\text{gEq/g}$, respectivamente. No obstante, debido a las altas

desviaciones estándar observadas, no se logró establecer una diferencia estadísticamente significativa con respecto al blanco.

La capacidad antioxidante registrada en las plántulas en las que se aplicaron los tratamientos por aspersión (D) mostró una disminución tras la aplicación de NPsCS y NPsCS-Mi, en comparación con el blanco (agua). El tratamiento con NPsCS presentó un valor promedio de 198.6 $\mu\text{gEq/g}$, significativamente menor al observado en el blanco (278.0 $\mu\text{gEq/g}$). De manera similar, los tratamientos con NPsCS-Co, NPsCS-Mo y NPsCS-Trip también redujeron la capacidad antioxidante, registrando valores de 206.4, 213.2 y 229.3 $\mu\text{gEq/g}$, respectivamente. Cabe destacar que el tratamiento con NPsCS-Ni mostró la mayor disminución, alcanzando un valor significativamente inferior de 183.4 $\mu\text{gEq/g}$.

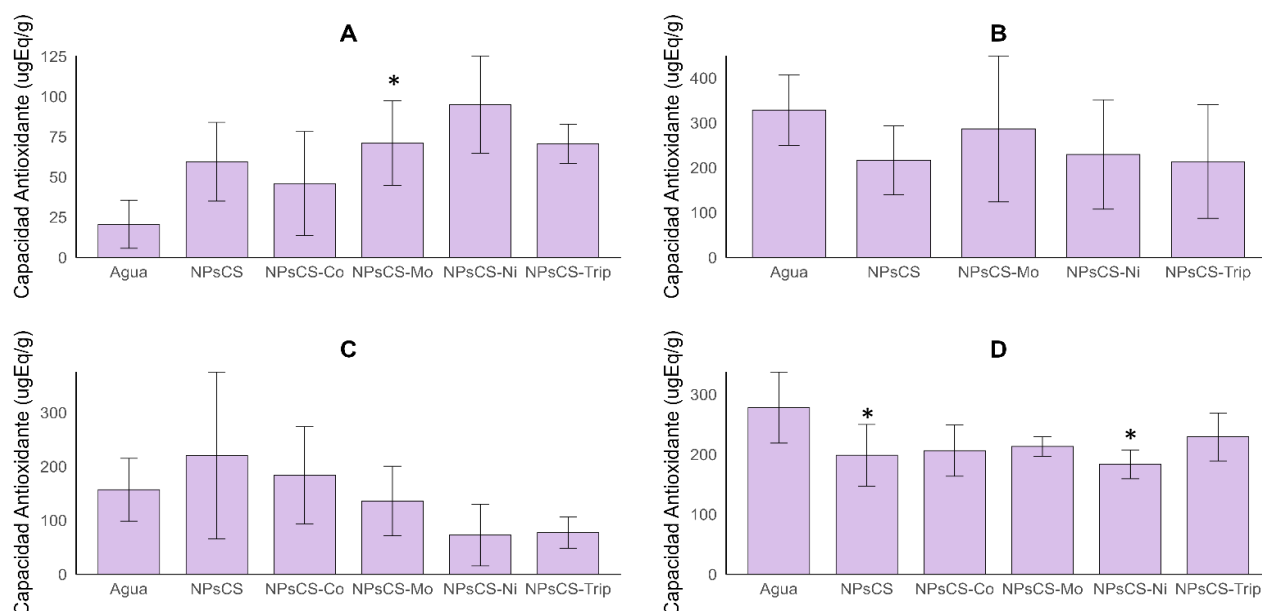


Figura 11. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre la capacidad antioxidante de tallos plántulas de melón en los diferentes sistemas de cultivo: taco (A), caja Petri (B), sustrato (C), por aspersión (D). *Los datos se expresan en equivalentes de ácido gálico y son la media $\pm$ desviación estándar. *=indica diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.05$)

Aunque se observó un aumento en la cantidad de fenoles totales en ciertos tratamientos, este no siempre se tradujo en una mayor capacidad antioxidante. Esto podría atribuirse a que no todos los compuestos fenólicos presentes poseen actividad antioxidante directa, o bien hay diferencias

en la calidad y función específica de los fenoles sintetizados, como se ha reportado en estudios previos (Foss et al., 2022; 2009; Wu et al., 2021).

En el sistema de cultivo en taco se podría relacionar la producción de fenoles con un aumento en la capacidad antioxidante, esto gracias a la aplicación de NPsCS y NPsCS-Mi que posiblemente promovieron la síntesis de compuestos fenólicos, así como la de enzimas antioxidantes y su respuesta para contrarrestar el estrés oxidativo, como mencionan algunos autores (Hao et al., 2016; Hidangmayum & Dwivedi, 2022; Sheikhalipour et al., 2021) sobre la estimulación del sistema inmune y la expresión de genes. De igual manera, esta respuesta podría estar relacionada a las condiciones de cultivo que mantuvo una mayor humedad y menor exposición a la luz, lo que moduló la liberación de las NPsCS, así como un posible estímulo en la planta (Szymańska & Winnicka, 2015b; Yáñez-Chávez et al., 2018).

Como se ha mencionado, una alta concentración o acumulación de NPsCS puede generar efectos adversos en el metabolismo de la planta, representando un factor abiótico de estrés, provocando la inhibición de algunas rutas metabólicas o de enzimas (Allam et al., 2024; Choudhary et al., 2017). Se observó un patrón similar de respuesta entre los sistemas de cultivo en caja y sustrato, en los que no se logró mantener una humedad constante u óptima, además de que, las condiciones propias del sistema mantuvieron en mayor exposición a la semilla y posteriormente a la plántula. Adicionalmente, aunque no se mantiene una proporción de la capacidad antioxidante en relación a la producción de fenoles, y de que la capacidad antioxidante de las plántulas con NPsCS-Mi fue menor al blanco en la mayoría de los tratamientos, se observan una diferencia de la capacidad antioxidante entre los blancos de cada sistema de cultivo, lo cual sugiere que, aun en ausencia de nanopartículas, las plantas activaron rutas antioxidantes como mecanismos de defensa frente al estrés causado por las condiciones del cultivo. Lo que refuerza la idea de que la diferencia en la respuesta a cada tratamiento entre los sistemas de cultivo estaría relacionada con las condiciones y propiedades de cada sistema.

7.3.4 Contenido de proteínas totales en tallos de plántulas de melón tratadas con NPsCS-Mi

La cuantificación de proteínas totales permite evaluar el estado metabólico general de una planta, ya que las proteínas participan en procesos clave como la fotosíntesis, defensa y crecimiento (Bellaloui & Kassem, 2021). En este estudio, se utilizó la técnica de Bradford, basada

en la unión del colorante Coomassie Blue a proteínas, lo que permite detectar cambios en su concentración. En la Figura 12 se muestra el contenido de proteínas totales en las plántulas de melón donde se observa que varían según el método de aplicación.

Para el sistema de cultivo en taco (A) la concentración de proteínas en agua (blanco) fue de 8.9 $\mu\text{gEq/g}$ y una ligera disminución con la aplicación de NPsCS reduciéndose hasta 7.7 $\mu\text{gEq/g}$ en promedio. Un efecto similar se observó con la aplicación de NPsCS-Co, NPsCS-Mo y NPsCS-Trip que redujeron su concentración promedio de proteínas a 4.5, 8 y 7.7 $\mu\text{gEq/g}$, respectivamente, siendo el tratamiento con NPsCS-Co estadísticamente inferior al blanco. Por otro lado, el tratamiento con NPsCS-Ni presentó un ligero incremento, alcanzando una media de 9.3 $\mu\text{gEq/g}$.

En el sistema de cultivo en sustrato (B), el desarrollo de las plántulas de melón mostró un patrón relativamente similar en la concentración de proteínas totales para la mayoría de los tratamientos, en comparación con el agua. El tratamiento con NPsCS (4.0 $\mu\text{gEq/g}$) no mostró diferencias significativas respecto al blanco (3.3 $\mu\text{gEq/g}$), similar al comportamiento que se observó en los tratamientos con NPsCS-Co (3.6 $\mu\text{gEq/g}$) y NPsCS-Trip (3.4 $\mu\text{gEq/g}$). No obstante, los tratamientos con NPsCS-Mo (3.0 $\mu\text{gEq/g}$) y NPsCS-Ni (2.7 $\mu\text{gEq/g}$) presentaron una ligera disminución en la síntesis de proteínas.

Por su parte, el sistema de cultivo por aspersión (C) mostró que la concentración de proteínas en el tratamiento con agua (blanco) fue de 1.2 $\mu\text{gEq/g}$, mientras que con la aplicación de NPsCS fue de 1.5 $\mu\text{gEq/g}$ en promedio. En contraste, la aplicación de NPsCS-Co y NPsCS-Ni aumentaron la producción de proteínas hasta 2 y 1.9 $\mu\text{gEq/g}$, respectivamente. El tratamiento con NPsCS-Mo mostró resultados similares al blanco con 1.2 $\mu\text{gEq/g}$ mientras que las NPsCS-Trip fue el tratamiento menos favorecido que redujo sus valores promedio de proteína hasta 1 $\mu\text{gEq/g}$. A pesar de que algunos de los valores muestran aparente diferencia, no se logró refutar una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

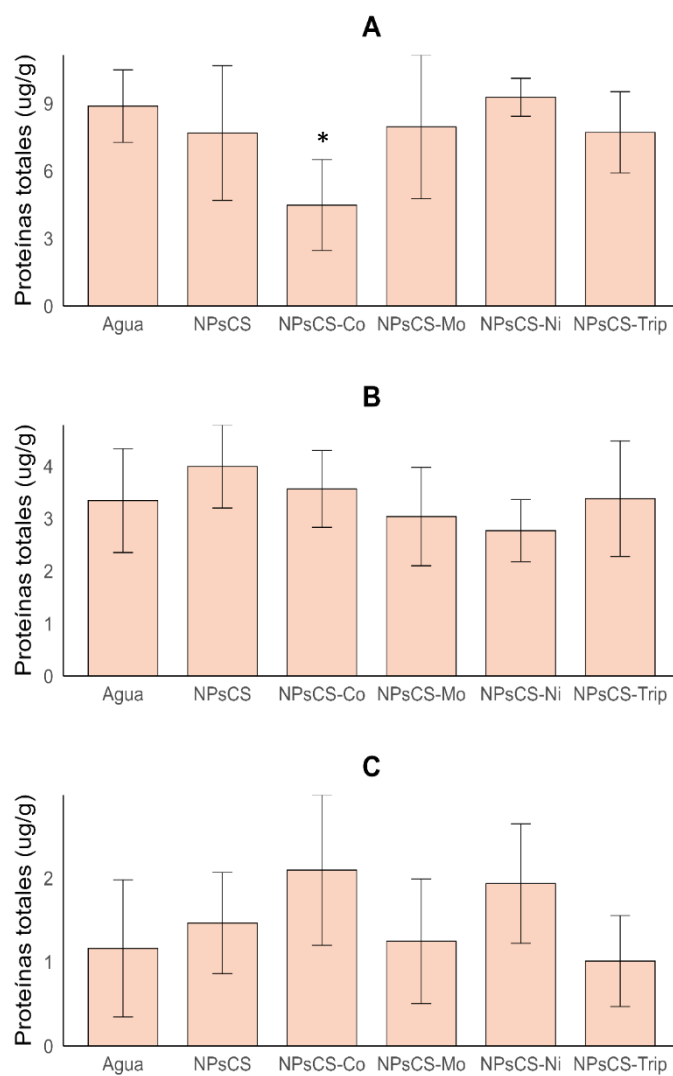


Figura 12. Efecto de la aplicación de NPsCS-Mi sobre el contenido de proteínas totales en tallos de plántulas de melón en los diferentes sistemas de cultivo: taco (A), caja Petri (B) y sustrato (C). *Los datos se expresan en equivalentes de albúmina de suero bovino (BSA) y son la media $\pm$ desviación estándar. *=indica diferencia significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

Aunque varios mecanismos de los efectos de las NPsCS en plántulas no se han estudiado, es posible que la disminución en el contenido proteico este asociado a un efecto tóxico derivado de la concentración de micronutrientes, generando estrés fisiológico en las plántulas, así como posibles alteraciones, en síntesis, funcionalidad y acumulación de las proteínas en la célula (Akeel & Jahan, 2020; Hao *et al.*, 2016; Shahid, 2021). Adicionalmente, no se descarta que

parte de la disminución en el contenido proteico esté relacionada con procesos de degradación durante el manejo de las muestras, posiblemente asociados a la actividad de proteasas o a condiciones no óptimas de almacenamiento y procesamiento (Scopes, 1994; Taiz et al., 2015; Wilson & Walker, 2010)

Por otro lado, un mayor contenido de proteínas en algunos de los tratamientos con NPsCS, en comparación con el blanco, podría estar relacionada con el efecto protector del quitosán frente al estrés oxidativo (Edo *et al.*, 2024; Hadidi *et al.*, 2020), reduciendo la degradación proteica, tal como ha sido reportado por Liu et al. (2009). Este biopolímero ha demostrado actuar como antioxidante y bioestimulante, favoreciendo tanto la integridad de las proteínas existentes como la activación de rutas metabólicas que conducen a su síntesis.

La respuesta pudo verse modificada debido al efecto propio de cada micronutriente, dado que cada micronutriente estimula o inhibe procesos metabólicos en la planta fungiendo como elicitador, cofactor enzimático o estimulante (Shahid, 2021), de igual modo, el efecto de liberación pudo no ser controlada, liberándose rápidamente o de manera no unioforme (R. Kumar et al., 2022; Sidhu et al., 2025). El tratamiento con NPsCS-Ni pudo haber actuado como cofactor favoreciendo la actividad de enzimas asimiladoras de nitrógeno (Patra *et al.*, 2020). También Hu y colaboradores en 2021 reportan la funcionalidad del cobalto para la síntesis y activación de diversas enzimas en el desarrollo y respuesta antiestrés, lo que las NPsCS-Co pudieron haber favorecido estos procesos, mejorando ligeramente los valores de proteína total. La cantidad suministrada de molibdeno, en general no muestra un efecto significativo en el estado fisiológico de la planta, dado que no se muestra gran alteración en la cantidad de clorofilas, respuesta antioxidante, ni en la cantidad de proteínas, efectos similares se observan con la aplicación de otros elementos a concentraciones muy reducidas (Iavicoli *et al.*, 2018) los cuales requirieron un mayor tiempo de observación para analizar su efecto (Hosseini et al., 2013; Shiraishi *et al.*, 1993).

CONCLUSIONES

Fue posible sintetizar nanopartículas de quitosán (NPsCS) mediante gelificación iónica con TPP, tanto en su forma pura como complejadas con micronutrientes esenciales como: Ni, Co y Mo, de manera individual y conjunta (NPsCS-Trip). Los rendimientos superaron el 37 %, alcanzando hasta 45 % en el caso de las NPsCS-Trip. La caracterización fisicoquímica y estructural confirmó la incorporación de los micronutrientes en las NPsCS-Mi, con una eficiencia cercana al 70 % respecto a la cantidad teórica añadida. El tamaño de partícula se encontró entre 204–465 nm y el potencial Zeta fue superior a +30 mV, lo que indica buena estabilidad coloidal. Además, los análisis térmicos (TGA y DSC) y estructurales (DRX) mostraron que las NPsCS-Mi presentan una mayor estabilidad térmica y modificaciones en la cristalinidad respecto a las NPsCS puras.

En la evaluación biológica en semillas y plántulas de melón, las NPsCS y en particular las NPsCS-Ni favorecieron la germinación y el desarrollo radicular, principalmente en condiciones de humedad alta y baja exposición a la luz (sistema taco). En contraste, algunas formulaciones como las NPsCS-Trip redujeron la germinación en sistemas de caja y sustrato, lo que sugiere posibles efectos de toxicidad por acumulación iónica.

Los análisis bioquímicos indicaron que las NPsCS-Mi influyen en la respuesta metabólica de las plántulas, aumentando la acumulación de compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante y en algunos casos el contenido de proteínas (especialmente con NPsCS-Ni). Sin embargo, también se observó una ligera disminución en el contenido de clorofilas, principalmente clorofila b.

En conjunto, los resultados demuestran que las NPsCS-Mi constituyen una alternativa sustentable y eficiente para la entrega controlada de micronutrientes, al favorecer la germinación y estimular respuestas bioquímicas asociadas a la tolerancia al estrés. Entre los complejos evaluados, las NPsCS-Ni mostraron el mejor desempeño, confirmando su aplicación potencial como bioestimulantes en la agricultura.

TRABAJO A FUTURO

Basado en los resultados obtenidos durante la síntesis y aplicación se recomienda lo siguiente:

1.- Optimización del proceso de síntesis

Evaluar y ajustar los parámetros de síntesis para mejorar el rendimiento, estabilidad y homogeneidad de las nanopartículas. Asimismo, analizar la disponibilidad y liberación de los micronutrientes, con el fin de asegurar una entrega eficiente a la plántula.

2.- Diseño experimental enfocado por tipo de micronutriente

Para distinguir los efectos de cada micronutriente, se sugiere aplicar tratamientos de cada uno por separado a diferentes concentraciones; así como de los tratamientos con micronutrientes solos. Esto permitiría comprender mejor el efecto individual del quitosán y del micronutriente en la plántula.

3.- Extensión temporal del experimento en plántulas

Se plantea extender el tiempo de observación del desarrollo de plántulas bajo condiciones controladas en un sólo sistema de cultivo. Esto permitiría evaluar con mayor claridad los efectos fisiológicos a largo plazo de las NPsCS-Mi y descartar efectos atribuibles a la etapa de aplicación o al sistema de cultivo utilizado.

4.- Estudio de fitohormonas en etapas tempranas

Para comprender mejor el efecto de las NPsCS-Mi sobre la germinación, se recomienda analizar los niveles de fitohormonas como ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) durante las primeras etapas de la germinación.

5.- Evaluación de marcadores de estrés y daño celular

Dado que se observaron diferencias en las propiedades bioquímicas de las plantas, se sugiere evaluar la actividad enzimática relacionada con el estrés, en particular indicadores de peroxidación lipídica, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño a proteínas específicas. Esto podría ayudar a explicar posibles efectos tóxicos o beneficiosos según el tratamiento.

REFERENCIAS

- Abd El-Aziz, M. E., Morsi, S. M. M., Salama, D. M., Abdel-Aziz, M. S., Abd Elwahed, M. S., Shaaban, E. A., & Youssef, A. M. (2019). Preparation and characterization of chitosan/polyacrylic acid/copper nanocomposites and their impact on onion production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 856–865. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.155>
- Ahmad, I., Hussain, M., Ashraf, M., Ahmad, R., & Ashraf, M. (2009). Effect of nickel on seed germinability of some elite sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars. *Pakistan Journal of Botany*, 41, 1871-1882.
- Akeel, A., & Jahan, A. (2020). Role of Cobalt in Plants: Its Stress and Alleviation. En M. Naeem, A. A. Ansari, & S. S. Gill (Eds.), *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management* (pp. 339–357). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_17
- Alehosseini, E., Shahiri Tabarestani, H., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2022). Physicochemical, Thermal, and Morphological Properties of Chitosan Nanoparticles Produced by Ionic Gelation. *Foods*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/foods11233841>
- Ali, S. W., Rajendran, S., & Joshi, M. (2011). Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 438–446. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.004>
- Allam, E., El-Darier, S., Ghattass, Z., Fakhry, A., & Elghobashy, R. M. (2024). Application of chitosan nanoprimer on plant growth and secondary metabolites of *Pancreaticum maritimum* L. *BMC Plant Biology*, 24(1), 466. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05148-8>
- Barrera, J., Suárez, D., & Melgarejo, L. M. (2010). *ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS* (pp. 25–38).
- Bellaloui, N., & Kassem, M. A. (2021). Seed Protein, Oil, Fatty Acids, and Amino Acids: Effects of Genetic and Environmental Factors. En M. A. Kassem (Ed.), *Soybean Seed Composition: Protein, Oil, Fatty Acids, Amino Acids, Sugars, Mineral Nutrients, Tocopherols, and Isoflavones* (pp. 1–23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-82906-3_1
- Bhatt, S., Pathak, R., Punetha, V. D., & Punetha, M. (2024). Chitosan nanocomposites as a nano-bio tool in phytopathogen control. *Carbohydrate Polymers*, 331, 121858. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.121858>
- Biao, L., Tan, S., Wang, Y., Guo, X., Fu, Y., Xu, F., Zu, Y., & Liu, Z. (2017). Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 73–80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.154>

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cárdenas-Triviño, G., Elgueta, C., Vergara, L., Ojeda, J., Valenzuela, A., & Cruzat, C. (2017). Chitosan doped with nanoparticles of copper, nickel and cobalt. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 498–507.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.040>
- Caro-León, F. J., López-Martínez, L. M., Lizardi-Mendoza, J., Argüelles-Monal, W., Goycoolea-Valencia, F. M., Carvajal-Millán, E., & López-Franco, Y. L. (2019). Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano: una revisión. *Biotecnia*, 21(3), 13–25.
<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i3.1007>
- Carrasco-Sandoval, J., Aranda, M., Henríquez-Aedo, K., Fernández, M., López-Rubio, A., & Fabra, M. J. (2023). Impact of molecular weight and deacetylation degree of chitosan on the bioaccessibility of quercetin encapsulated in alginate/chitosan-coated zein nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124876.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124876>
- Chamnanmanoontham, N., Pongprayoon, W., Pichayangkura, R., Roytrakul, S., & Chadchawan, S. (2015). Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. *Plant Growth Regulation*, 75(1), 101–114.
<https://doi.org/10.1007/s10725-014-9935-7>
- Chandra Hembram, K., Prabha, S., Chandra, R., Ahmed, B., & Nimesh, S. (2016). Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 305–314.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2014.948548>
- Choudhary, R., Joshi, A., Kumari, S., R V, K., & Saharan, P. (2017). *Preparation of Cu-chitosan nanoparticle and its effect on growth and enzyme activity during seed germination in maize*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20701.31200>
- Chouhan, D., Dutta, A., Kumar, A., Mandal, P., & Choudhuri, C. (2022). Application of nickel chitosan nanoconjugate as an antifungal agent for combating Fusarium rot of wheat. *Scientific Reports*, 12(1), 14518. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18670-2>
- Datta, D., Ghosh, S., Kumar, S., Gangola, S., Majumdar, B., Saha, R., Mazumdar, S. P., Singh, S. V., & Kar, G. (2024). Microbial biosurfactants: Multifarious applications in sustainable agriculture. *Microbiological Research*, 279, 127551.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127551>
- Deshpande, P., Dapkekar, A., Oak, M. D., Paknikar, K. M., & Rajwade, J. M. (2017). Zinc complexed chitosan/TPP nanoparticles: A promising micronutrient nanocarrier suited for foliar application. *Carbohydrate Polymers*, 165, 394–401.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.061>

- DI BENEDETTO, A., & TOGNETTI, J. (2016). Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(3), 258–282. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86449712008>
- Ding, L., Huang, Y., Cai, X., & Wang, S. (2019). Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. *Carbohydrate Polymers*, 208, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.015>
- Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0670-y>
- Djanaguiraman, M., Anbazhagan, V., Dhankher, O. P., & Prasad, P. V. V. (2024). Uptake, Translocation, Toxicity, and Impact of Nanoparticles on Plant Physiological Processes. *Plants*, 13(22). <https://doi.org/10.3390/plants13223137>
- Elshamly, A. M. S., & Nassar, S. M. A. (2023). The Impacts of Applying Cobalt and Chitosan with Various Water Irrigation Schemes at Different Growth Stages of Corn on Macronutrient Uptake, Yield, and Water Use Efficiency. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23(2), 2770–2785. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01233-3>
- Fabiano, C., Tezotto, T., Favarin, J. L., Polacco, J. C., & Mazzafera, P. (2015). Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. *Frontiers in Plant Science, Volume 6-2015*. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2015.00754>
- Farooq, M. A., Ma, W., Shen, S., & Gu, A. (2022). Underlying Biochemical and Molecular Mechanisms for Seed Germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158502>
- Foss, K., Przybyłowicz, K., & Sawicki, T. (2022). Antioxidant Activity and Profile of Phenolic Compounds in Selected Herbal Plants. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-00989-w>
- Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J., Wang, D., Fotis, C., Sparer, A., Ma, X., Berg, R., & Geisler, M. (2014). Reproductive Toxicity and Life History Study of Silver Nanoparticle Effect, Uptake and Transport in Arabidopsis thaliana. *Nanomaterials*, 4, 301–318. <https://doi.org/10.3390/nano4020301>
- Gingas, D., Mindru, I., Patron, L., Ianculescu, A., Vasile, E., Marinescu, G., Preda, S., Diamandescu, L., Oprea, O., Popa, M., Saviuc, C., & Chifiriuc, M. C. (2018). Synthesis and Characterization of Chitosan-Coated Cobalt Ferrite Nanoparticles and Their Antimicrobial Activity. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28(5), 1932–1941. <https://doi.org/10.1007/s10904-018-0870-3>
- Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, 20(4), 291–300. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.654121>
- Guan, Y., Hu, J., Wang, X., & Shao, C. (2009). Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low

- temperature stress. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(6), 427–433.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B0820373>
- Guo, Y., Qiao, D., Zhao, S., Zhang, B., & Xie, F. (2024). Advanced functional chitosan-based nanocomposite materials for performance-demanding applications. *Progress in Polymer Science*, 101872. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2024.101872>
- Hao, Y., Zhang, Z., Yukui, R., Ren, J.-Y., Hou, T.-Q., Wu, S.-J., Rui, M.-M., Jiang, F.-P., & Liu, L.-M. (2016). *Effect of Different Nanoparticles on Seed Germination and Seedling Growth in Rice*. <https://doi.org/10.2991/ame-16.2016.28>
- Hassan, M., Umer Chattha, M., Khan, I., Chattha, M., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A., Khan, M., & Khan, T. (2019). Nickel toxicity in plants: Reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04892-x>
- HEWITT, E. J., & BOND, G. (1966). The Cobalt Requirement of Non-legume Root Nodule Plants. *Journal of Experimental Botany*, 17(3), 480–491. <https://doi.org/10.1093/jxb/17.3.480>
- Hidangmayum, A., & Dwivedi, P. (2022). Chitosan Based Nanoformulation for Sustainable Agriculture with Special Reference to Abiotic Stress: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(4), 1264–1283. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02296-y>
- Hu, X., Wei, X., Ling, J., & Chen, J. (2021). Cobalt: An Essential Micronutrient for Plant Growth? *Frontiers in Plant Science, Volume 12-2021*. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.768523>
- Huang, X.-Y., Hu, D.-W., & Zhao, F.-J. (2022). Molybdenum: More than an essential element. *Journal of Experimental Botany*, 73(6), 1766–1774. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab534>
- Hussein, M. H. M., El-Hady, M. F., Sayed, W. M., & Hefni, H. (2012). Preparation of some chitosan heavy metal complexes and study of its properties. *Polymer Science Series A*, 54(2), 113–124. <https://doi.org/10.1134/S0965545X12020046>
- Ioelovich, M. (2014). Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan. *Res. Rev. J. Chem.*, 3, 7–14.
- Jha, R., & Mayanovic, R. A. (2023). A Review of the Preparation, Characterization, and Applications of Chitosan Nanoparticles in Nanomedicine. *Nanomaterials*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/nano13081302>
- Kahdestani, S. A., Shahriari, M. H., & Abdouss, M. (2021). Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles containing teicoplanin using sol–gel. *Polymer Bulletin*, 78(2), 1133–1148. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03134-2>
- Kaiser, B., Gridley, K., Brady, J., Phillips, T., & Tyerman, S. (2005). The Role of Molybdenum in Agricultural Plant Production. *Annals of botany*, 96, 745–754. <https://doi.org/10.1093/aob/mci226>

- Karamchandani, B. M., Chakraborty, S., Dalvi, S. G., & Satpute, S. K. (2022). Chitosan and its derivatives: Promising biomaterial in averting fungal diseases of sugarcane and other crops. *Journal of Basic Microbiology*, 62(5), 533–554.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.202100613>
- Karamchandani, B. M., Dalvi, S. G., Bagayatkar, M., Banat, I. M., & Satpute, S. K. (2024). Prospective applications of chitosan and chitosan-based nanoparticles formulations in sustainable agricultural practices. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58, 103210.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103210>
- Kashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36–51.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>
- Kastori, R., Putnik-Delić, M., & Maksimović, I. (2022). Functions of nickel in higher plants: A review. *Acta agriculturae Serbica*, 27(53), 89–101. <https://doi.org/10.5937/aaser2253089k>
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., & Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0139-6>
- Khalifa, N. (2018). The effect of Chitosan-PMAA-NPK nanofertilizer on Pisum sativum plants. 3 *Biotech*, 8. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1221-3>
- Kováčik, J., Klejdus, B., & Bačkor, M. (2009). Phenolic metabolism of *Matricaria chamomilla* plants exposed to nickel. *Journal of Plant Physiology*, 166(13), 1460–1464.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.03.002>
- Kumar, R., Kumar, N., Rajput, V. D., Mandzhieva, S., Minkina, T., Saharan, B. S., Kumar, D., Sadh, P. K., & Duhan, J. S. (2022). Advances in Biopolymeric Nanopesticides: A New Eco-Friendly/Eco-Protective Perspective in Precision Agriculture. *Nanomaterials*, 12(22).
<https://doi.org/10.3390/nano12223964>
- Kumar, V., BM, D., & P.N., S. (2016a). Synthesis, Characterization and Applications of Nanochitosan/Sodium Alginate/Microcrystalline Cellulose Film. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 07. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000419>
- Kumar, V., BM, D., & P.N., S. (2016b). Synthesis, Characterization and Applications of Nanochitosan/Sodium Alginate/Microcrystalline Cellulose Film. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 07. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000419>
- Kumaraswamy, R. V., Saharan, V., Kumari, S., Chandra Choudhary, R., Pal, A., Sharma, S. S., Rakshit, S., Raliya, R., & Biswas, P. (2021). Chitosan-silicon nanofertilizer to enhance plant growth and yield in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 159, 53–66.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.054>
- LEÓN, Y., CÁRDENAS, G., & ARIAS, M. (2017). SYNTHESIS AND CHARACTERIZATIONS OF METALLIC NANOPARTICLES IN CHITOSAN BY CHEMICAL REDUCTION. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 62, 3760–3764.

- Leubner, G. (2003). Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*, 13, 17–34. <https://doi.org/10.1079/SSR2002121>
- Li, R., He, J., Xie, H., Wang, W., Bose, S. K., Sun, Y., Hu, J., & Yin, H. (2019). Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 91–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.118>
- Luo, Y., Zhang, B., Cheng, W.-H., & Wang, Q. (2010). Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 942–951. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.029>
- Lustriane, C., Dwivany, F., Suendo, V., & Reza, M. (2018). Effect of chitosan and chitosan-nanoparticles on post harvest quality of banana fruits. *Journal of Plant Biotechnology*, 45, 36–44. <https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.1.036>
- mármol, zulay, Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello-Mazzarri, C., Chandler, C., & Gutierrez, E. (2012). Quitina y Quitosano, polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*.
- Mendel, R. R., & Hänsch, R. (2002). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(375), 1689–1698. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf038>
- Mihaela Predescu, A., Ecaterina, M., Maria, R., Cristian, P., George, C., Simona, S., Elena, E. P., & and Predescu, C. (2019). Adsorption of Lead(II) from Aqueous Solution Using Chitosan and Polyvinyl Alcohol Blends. *Analytical Letters*, 52(15), 2365–2392. <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1588286>
- Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P. C., & Maitra, A. N. (2001). Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *Journal of Controlled Release*, 74(1), 317–323. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00342-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00342-X)
- Ortega-Ortíz, H., Pérez-Labrada, F., Cadenas-Pliego, G., & Benavides-Mendoza, A. (2016). Cu Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological, production, and quality characteristics of tomato. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89, 183–189. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.023>
- PAGE, V., & FELLER, U. R. S. (2005). Selective Transport of Zinc, Manganese, Nickel, Cobalt and Cadmium in the Root System and Transfer to the Leaves in Young Wheat Plants. *Annals of Botany*, 96(3), 425–434. <https://doi.org/10.1093/aob/mci189>
- Parthasarathy, R., Jayabaskaran, C., Manikandan, A., & Anusuya, S. (2023). Synthesis of Nickel-Chitosan Nanoparticles for Controlling Blast Diseases in Asian Rice. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(3), 2134–2148. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04198-8>

- Patra, A., Dutta, A., Mohapatra, K. K., & Pradhan, S. (2020). Nickel the Ultra-micronutrient: Significant for Plant Growth and Metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 1, 35–37.
- Paul, M. J., & Foyer, C. H. (2001). Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1383–1400. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.360.1383>
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., & Bednarek, P. (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*, 206, 948–964. <https://doi.org/10.1111/nph.13325>
- Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., & Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 267–274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.009>
- Rabinovich, A., Di, R., Lindert, S., & Heckman, J. (2024). Nickel and Soil Fertility: Review of Benefits to Environment and Food Security. *Environments*, 11. <https://doi.org/10.3390/environments11080177>
- Raza, Z. A., Khalil, S., Ayub, A., & Banat, I. M. (2020). Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. *Carbohydrate Research*, 492, 108004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108004>
- Riseh, R. S., Vazvani, M. G., Vatankhah, M., & Kennedy, J. F. (2024). Chitosan coating of seeds improves the germination and growth performance of plants: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134750>
- Rodrigues, A., Ribeiro, A., & António, C. (2019). Experimental Design and Sample Preparation in Forest Tree Metabolomics. *Metabolites*, 9, 285. <https://doi.org/10.3390/metabo9120285>
- Saberi Riseh, R., Vatankhah, M., Hassanisaadi, M., & Varma, R. S. (2024). A review of chitosan nanoparticles: Nature's gift for transforming agriculture through smart and effective delivery mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 260, 129522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129522>
- Sacco, P., Pedroso-Santana, S., Kumar, Y., Joly, N., Martin, P., & Bocchetta, P. (2021). Ionotropic Gelation of Chitosan Flat Structures and Potential Applications. *Molecules*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/molecules26030660>
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., & Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346–353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>
- Samah, B., Tahtat, D., Assia, nacer-khodja, Mahlous, M., Hammache, Y., Guittoum, A., & Kebbouche-Gana, S. (2023). Chitosan nanoparticles with controlled size and zeta potential. *Polymer Engineering & Science*, 63. <https://doi.org/10.1002/pen.26261>
- Santander-Ortega, M. J., Peula-García, J. M., Goycoolea, F. M., & Ortega-Vinuesa, J. L. (2011). Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on

- electrokinetic behaviour and colloidal stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 571–580. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.019>
- Saravana kumari, P., Ramkumar, S., Seethalaxmi, M., Rekha, T., Abiyoga, M., Baskar, V., & Sureshkumar, S. (2024). Biofortification of crops with nutrients by the application of nanofertilizers for effective agriculture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 212, 108772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108772>
- Scopes, R. K. (1994). *Protein Purification: Principles and Practice* (3rd ed.). Springer-Verlag.
- Senthilkumar, P., Yaswant, G., Kavitha, S., Chandramohan, E., Kowsalya, G., Vijay, R., Sudhagar, B., & Kumar, D. S. R. S. (2019). Preparation and characterization of hybrid chitosan-silver nanoparticles (Chi-Ag NPs); A potential antibacterial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 290–298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.234>
- Shahid, M. (2021). Effect of soil amendments on trace element-mediated oxidative stress in plants: Meta-analysis and mechanistic interpretations. *Journal of Hazardous Materials*, 407, 124881. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124881>
- Sharma, G., Kumar, A., Devi, K. A., Prajapati, D., Bhagat, D., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., & Saharan, V. (2020). Chitosan nanofertilizer to foster source activity in maize. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 226–234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.155>
- Sharma, G., Saharan, V., Pal, A., & Sharma, S. S. (2024). Chitosan nanofertilizer to strengthen sink strength and provide resistance against PFSR (post flowering stalk rot) disease in maize. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 60, 103303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103303>
- Sheikhalipour, M., Esmailpour, B., Behnamian, M., Gohari, G., Giglou, M. T., Vachova, P., Rastogi, A., Brestic, M., & Skalicky, M. (2021). Chitosan–Selenium Nanoparticle (Cs–Se NP) Foliar Spray Alleviates Salt Stress in Bitter Melon. *Nanomaterials*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/nano11030684>
- Shrivastava, M., Srivastav, A., Gandhi, S., Rao, S., Roychoudhury, A., Kumar, A., Singhal, R. K., Jha, S. K., & Singh, S. D. (2019). Monitoring of engineered nanoparticles in soil-plant system: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 11, 100218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enmm.2019.100218>
- Sidhu, A. K., Verma, N., Kaushal, P., Agrawal, S. B., & Bhatia, S. (2025). Green synthesis of polymeric nanoparticles: agricultural applications and toxicological implications. *Discover Applied Sciences*, 7(6), 505. <https://doi.org/10.1007/s42452-025-06877-7>
- Sivakami, M. S., Gomathi, T., Venkatesan, J., Jeong, H.-S., Kim, S.-K., & Sudha, P. N. (2013). Preparation and characterization of nano chitosan for treatment wastewaters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 204–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.005>

- Soto, C., Herráez-Hernández, R., & Campíns-Falcó, P. (2023). Determination of chlorophylls a and b and β -carotene in environmental waters: Diminishing wastes and analysis time by in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to nano liquid chromatography. *Advances in Sample Preparation*, 8, 100093.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sampre.2023.100093>
- Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015a). Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 13, 1819–1846.
<https://doi.org/10.3390/md13041819>
- Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015b). Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 13, 1819–1846.
<https://doi.org/10.3390/md13041819>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development* (6th ed.). Sinauer Associates.
- Trejo-Téllez, L. I., & Gómez-Merino, F. C. (2023). Editorial: Beneficial elements: novel players in plant biology for innovative crop production, volume II. *Frontiers in Plant Science, Volume 14-2023*. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1303462>
- Vanti, G. L., Masaphy, S., Kurjogi, M., Chakrasali, S., & Nargund, V. B. (2020). Synthesis and application of chitosan-copper nanoparticles on damping off causing plant pathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 1387–1395.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.179>
- Verma, D., Malik, R., Meena, J., Rameshwari, R., & Meena, D. (2021). Synthesis, characterization and applications of chitosan based metallic nanoparticles: A review. *Journal of Applied and Natural Science*, 13. <https://doi.org/10.31018/jans.v13i2.2635>
- Wang, J., Yuan, Y., Liu, Y., Li, X., & Wu, S. (2024). Application of chitosan in fruit preservation: A review. *Food Chemistry: X*, 23, 101589.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101589>
- Wang, X., Du, Y., & Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 21–26.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.11.007>
- Wang, Z. Y., Y. L., T., & Zhang, F. S. (1999). Effect of molybdenum on growth and nitrate reductase activity of winter wheat seedlings as influenced by temperature and nitrogen treatments. *Journal of Plant Nutrition*, 22(2), 387–395.
<https://doi.org/10.1080/01904169909365636>
- Weber, J.-N., Minner-Meinen, R., & Kaufholdt, D. (2024). The Mechanisms of Molybdate Distribution and Homeostasis with Special Focus on the Model Plant *Arabidopsis thaliana*. *Molecules*, 29(1). <https://doi.org/10.3390/molecules29010040>

- Wilson, K., & Walker, J. (2010). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (7th ed.). Cambridge University Press.
- Wu, S., Shen, D., Wang, R., Li, Q., Mo, R., Zheng, Y., Zhou, Y., & Liu, Y. (2021). Phenolic profiles and antioxidant activities of free, esterified and bound phenolic compounds in walnut kernel. *Food Chemistry*, 350, 129217.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129217>
- Xiao, Z., Wang, E., Zhu, G., Zhou, R., & Niu, Y. (2016). Preparation, characterization and rheological behavior of chitosan nanocapsule emulsion encapsulated tuberose fragrance. *Polish Journal of Chemical Technology*, 18(2), 1–8. <https://doi.org/10.1515/pjct-2016-0021>
- Yáñez-Chávez, L., Pedroza-Sandoval, A., Marínez-Salvador, M., Echavarría-Chairez, F., Velasquez-Valle, M., & Lopez, A. (2018). Uso de retenedores de humedad edáfica en la sobrevivencia y crecimiento de dos especies de pastos *Bouteloua curtipendula* [Michx.] Torr. y *Chloris gayana* Kunth. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9, 703–718.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i4.4333>
- Yu, M., Chengxiao, H., & Wang, Y. (1999). Influences of seed molybdenum and molybdenum application on nitrate reductase activity, shoot dry matter, and grain yields of winter wheat cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 22(9), 1433–1441.
<https://doi.org/10.1080/01904169909365724>
- Zhai, X., Zhang, C., Zhao, G., Stoll, S., Ren, F., & Leng, X. (2017). Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 4.
<https://doi.org/10.1186/s12951-016-0243-4>