

Efecto biológico de nanopartículas cargadas con ácido indolacético microbiano en parámetros morfométricos de tomate

María del Carmen Nely Andrade Ayala¹
Francisco Daniel Hernández Castillo^{1§}
Elan Iñaky Laredo Alcalá¹
Antonio Serguei Ledezma Pérez²
Carmen Natividad Alvarado Canché²
Jorge Romero García²

¹Departamento de Parasitología Agrícola-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (c.nely.andrade@gmail.com). ²Laboratorio de microbiología-Centro de Investigación en Química Aplicada. Enrique Reyna H. Núm. 140, San José de los Cerritos. Saltillo, Coahuila, México. CP. 25294. (elan.laredo@hotmail.com; antonio.ledezma@ciqa.edu.mx; carmen.alvarado@ciqa.edu.mx).

§Autor para correspondencia: fdanielhc@hotmail.com.

Resumen

El tomate es una de las hortalizas que mayor producción tienen a nivel mundial, por lo que para su fertilización y control de plagas se utilizan productos de origen sintético, que afectan el ecosistema donde son aplicados, por esta razón se buscan alternativas biológicamente sustentables. Una de esas alternativas es el uso del metabolismo microbiano, ejemplo de esto es *Botryodiplodia theobromae* hongo fitopatógeno capaz de producir fitohormonas a partir de su metabolismo, como es el ácido indolacético (AIA). Sin embargo, la aplicación exógena esta fitohormona presenta una degradación acelerada al ponerse en contacto con factores ambientales. Una alternativa para minimizar este efecto es la encapsulación con el uso de materiales biopoliméricos que tengan la capacidad de recubrir la fitohormona y al mismo tiempo permitir aumentar la efectividad del producto. En este trabajo se evaluó la eficiencia de encapsulación (EE) del AIA procedente del caldo microbiano por fermentación líquida de *B. theobromae* en nanopartículas (Np) de alginato/quitosán (ALG/QS); así como, su efectividad biológica representada en patrones morfológicos de desarrollo en plantas de tomate. Los resultados demostraron, que a partir del metabolismo microbiano de *Botryodiplodia theobromae* se produjo AIA, el cual una vez encapsulado alcanzo una EE de 90%, así como diversos tamaños de partícula. En relación con la efectividad biológica en plantas de tomate se observó que las Np cargadas con caldo microbiano y AIA grado sintético presentaron diferencia significativa en la mayoría los parámetros morfológicos en comparación con el testigo. Por lo que los nanosistemas cargados con bioestimulantes son una alternativa a futuro para la aplicación de bioestimulantes en hortalizas como el tomate.

Palabras clave: *Botryodiplodia theobromae*, ácido indolacético, nanoencapsulación.

Recibido: marzo de 2020

Aceptado: mayo de 2020

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza que más se cultiva a nivel mundial y nacional para su consumo fresco e industrial, en México la producción es de hasta 2 875 164 toneladas (SIAP, 2018). No obstante, el cultivo enfrenta una serie de dificultades como el manejo inadecuado de la fertilización, variedades de ciclos de producción cortos, ataque de plagas y enfermedades.

En la actualidad la solución para estos problemas es el uso desmedido de productos sintéticos que aumenten el rendimiento de producción del tomate, uno de los principales activos biológicos son los estimulantes y dentro de este grupo las hormonas reguladoras de crecimiento vegetal resaltan por su versátil aplicación (Terry *et al.*, 2010). Los reguladores de crecimiento se definen como compuestos naturales o sintéticos que interfieren en procesos de desarrollo de las plantas, estos al ser aplicados exógenamente en cultivos comerciales aumentan y mejoran la producción y calidad de los cultivos y productos obtenidos, por lo cual son ampliamente usados en agricultura (Rademacher, 2015).

Estas sustancias juegan un papel importante dentro de las plantas, las cuales los utilizan en bajas concentraciones, actuando a nivel celular durante diferentes etapas de desarrollo, dentro de este grupo, las más relevantes hasta el momento son giberelinas, auxinas, citoquininas, ácido jasmónico y etileno (Santo-Pereira *et al.*, 2017).

El ácido indolacético (AIA) es la auxina natural más importante presente en la mayoría de las plantas. Es una hormona vegetal que regula diversos procesos como: el crecimiento, la división celular y la formación de raíces, entre otras. Actualmente las auxinas más utilizadas son las que se obtienen por síntesis química; sin embargo, debido a los problemas de contaminación medioambientales que existen, su uso comienza a limitarse, por lo que la obtención de esta hormona mediante sistemas más comprometidos con el medio ambiente se torna relevante.

Una alternativa para este problema puede ser la síntesis metabólica a partir de microorganismos (Castillo *et al.*, 2005). Estudios realizados han demostrado que existen microorganismos capaces de producir fitohormonas como parte de su metabolismo, un representante de este tipo de microorganismos es el hongo *Botryodiplodia theobromae*, el cual cuenta con la capacidad de producir fitohormonas y una de las más destacadas es el AIA, que al ser aplicado exógenamente puede ser eficiente para incrementar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Rohwer y Erwin, 2010; Andolfi *et al.*, 2014).

Una gran desventaja en el uso de fitohormonas es que pueden perder su eficiencia biológica debido a factores ambientales como la degradación oxidativa, humedad, luz UV, temperatura y la lixiviación de compuestos por lluvias (Armendáriz-Barragán *et al.*, 2016; Bakry *et al.*, 2016). Debido a esta problemática, resulta conveniente explorar e investigar nuevas tecnologías con el fin de desarrollar alternativas en cuanto a su aplicación, una de estas es el uso de la nanotecnología (Lugo *et al.*, 2010; Agrawal y Rathore, 2014; Campos *et al.*, 2014).

Que gracias a sus virtudes efficientiza la aplicación de dosis, logrando disminuir la cantidad de ingrediente activo, así como garantizar un menor impacto del medio ambiente (Nuruzzaman *et al.*, 2016). Dentro de la nanotecnología, la producción de nanopartículas (NP) para encapsulación de

ingredientes activos utilizando polímeros naturales como el quitosano y alginato que permitan liberar de forma controlada y proteger el ingrediente activo surge como una opción para la aplicación de fitohormonas (Bakry *et al.*, 2016).

Existen diversos métodos para la producción de Np entre los que destacan la nano precipitación, spray de secado, pre gelación iónica, coacervación y extrusión, siendo todas efectivas para la encapsulación de compuestos, pero difiriendo en costos y tiempos en cuanto a proceso de producción.

El método de regulación iónica resulta sumamente atractivo debido al uso de biopolímeros que pueden adquirirse de forma natural (Nedovic *et al.*, 2011; El Asbahani *et al.*, 2015; Armendariz-Barragan *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2016). El objetivo de este trabajo fue producir Np de quitosano y alginato cargadas con AIA de origen microbiano, así como la evaluación de su eficiencia biológica en plantas modelo de tomate.

Materiales y métodos

Proceso de fermentación de *B. theobromae* para la producción de fitohormonas

Obtención de la cepa de *B. theobromae*

La cepa de *B. theobromae* se obtuvo a partir de la colección microbiológica del laboratorio de Micología y Biotecnología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. La cepa se aisló a partir de frutos de cacao procedente de la zona sureste de México. La conservación, incremento y desarrollo del microorganismo se realizó utilizando el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA).

Producción mediante fermentación líquida de AIA

El proceso de fermentación para obtener el AIA se realizó utilizando la metodología propuesta por Michelena (2001). Se usaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de medio Miersh (Sacarosa 50 g L⁻¹, KNO₃ 3 g L⁻¹; MgSO₄ 7H₂O 0.2 g L⁻¹; KCl 0.1 g L⁻¹; FeSO₄ 7H₂O 0.01 g L⁻¹; ZnSO₄ 7H₂O 0.01 g L⁻¹; MnSO₄ 0.001 g L⁻¹; Na₂MoO₄ 2H₂O 0.001 g L⁻¹; CuSO₄ 5H₂O 0.001 g L⁻¹ y extracto de levadura 0.1 g L⁻¹ modificado).

Los matraces con el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión durante 15 min y se inocularon con tres porciones de micelio con medio de cultivo de 5 mm de diámetro de la cepa de *B. theobromae* y se incubaron en completa oscuridad por 15 días a temperatura constante de 28 °C sin agitación ni aireación (Eng *et al.*, 2008).

Cuantificación de AIA

Para la curva de calibración se utilizó AIA grado reactivo de la casa comercial Sigma Aldrich. La determinación y cuantificación de AIA de la fermentación de *B. theobromae* se realizó inicialmente con una concentración química del caldo microbiano, utilizando el sobrenadante del caldo al cual se le agregó un volumen igual de acetato de etilo como solvente.

Posteriormente la concentración del líquido se llevó a secado absoluto utilizando un liofilizador, una vez que se obtuvo el material seco se suspendió en metanol y se realizó la cuantificación mediante la técnica de microplaca propuesta por Anguiano *et al.* (2017). Para la curva de calibración se colocaron en la fila de una microplaca 100 μL de disolvente (metanol), posteriormente en la primera línea se agregaron 100 μL de solución stock a 100 ppm.

Para obtener un primer punto de 50 ppm, se mezcló y se transfirió 100 μL a la segunda línea (25 ppm). Este procedimiento se sigue hasta la línea 11 que es la concentración 0. Se añaden 100 μL del revelador salkowski a cada pocillo, se incuban durante 30 minutos y se leen a 520 nm. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado (Anguiano, 2017).

Producción de Np

Para la producción de las Np se utilizó el método de pregelación ionotrópica propuesto por Sarmiento (2006), para esto se agregaron 3.75 mL de solución de CaCl_2 a 59 mL de solución de alginato de sodio (0.037% pH 4,9) con una bomba peristáltica (Ismatec, EW-78000-03) bajo agitación constante y vigorosa, posteriormente con la misma bomba peristáltica se añadieron 12.5 mL de solución de quitosano (0.07%, pH 4.6) a la solución de CaCl_2 y alginato de sodio y se mantuvo de nuevo en agitación constante y vigorosa durante 90 min. Este procedimiento se realizó con la presencia de la hormona (AG/QS/AIA), con el caldo microbiano (AG/QS/caldo) y sin la presencia de la hormona (AG/QS).

Caracterización de Np

El Np con y sin la presencia de la hormona se caracterizó en términos de tamaño, distribución y potencial zeta. Para las mediciones, las muestras se diluyeron a una concentración adecuada para su análisis, las diluciones se realizaron con agua destilada. La distribución y tamaños de las nanopartículas se determinaron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), (NanoSight NS 300, Malvern).

Las muestras se analizaron por triplicado, a 25 °C, con la luz dispersa detectada en un ángulo de 90°. Para la determinación del potencial zeta (mV) las muestras se evaluaron por triplicado, a 25 °C, utilizando el equipo (ZETA-check, Colloid metrix). En cuanto a la concentración de pH se utilizó un potenciómetro (ion meter 450, Corning) previamente calibrado. Finalmente, para la determinación del peso seco, las muestras se centrifugaron y posteriormente se liofilizaron para retirar el exceso de líquido, una vez secas se pesaron en una balanza analítica.

Eficiencia de encapsulación

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE) se centrifugo la solución con Np a 14000 rpm, a 10 °C por 15 min, posteriormente se tomó una muestra del sobrenadante y se liofilizo. Para determinar la concentración de la hormona en el sobrenadante. Se realizó la lectura en un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 520 nm. Esto se realizó por triplicado. La eficiencia de encapsulación se evaluó mediante las fórmulas propuestas por Wohlfart *et al.* (2011).

$$EE\% = \frac{\text{Peso de AIA cargado en Np}}{\text{Peso de AIA utilizado inicialmente}} \times 100; LC\% = \frac{\text{Peso de AIA en la formulación.}}{\text{Peso de AIA - NP cargadas}} \times 100$$

Efectividad biológica de Np en plantas de tomate

El experimento se estableció en una cámara bioclimática, a una temperatura de 26 °C, con foto periodos de 12 h y una humedad relativa aproximada de 70%. En estas condiciones y en charolas de germinación con sustrato estéril se sembraron semillas de tomate variedad Río Grande, al alcanzar una altura de 10-15 cm fueron trasplantadas a recipientes plásticos.

Para determinar la efectividad biológica se evaluaron 6 tratamientos: T1= Np sin cargar; T2= Np cargadas con AIA grado reactivo 140 mg L⁻¹; T3= Np cargadas con caldo microbiano 140 mg L⁻¹; T4= AIA grado reactivo 125 mg L⁻¹; T5= caldo microbiano 125 mg L⁻¹ y T6= testigo absoluto, se tomó una planta como unidad experimental y cada uno de los tratamientos conto con ocho repeticiones. Los tratamientos fueron aplicados al momento del trasplante, así como a los 15, 30 y 45 días después de la primera aplicación.

Estas se realizaron con ayuda de atomizadores asperjando directamente sobre el follaje de las plantas y la cantidad utilizada fue a punto de rocío, la concentración de los tratamientos se estimó en relación al peso seco obtenido a partir de la producción de nanopartículas y el contenido de hormona encapsulado, por lo que los tratamientos se prepararon a partir de la disolución del producto obtenido del secado por liofilización y posteriormente resuspendidos en un volumen de agua estimado a partir del gasto generado en una prueba preliminar para cubrir completamente el follaje de una planta de tomate con las condiciones previamente establecidas.

Se recolectaron datos respecto a los parámetros morfométricos presentados por las plantas los cuales fueron: diámetro de tallo, altura de planta, numero de hojas y contenido de clorofila expresado mediante unidades SPAD 502 (Minolta). Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba de comparación de medias Tukey al 0.05% de significancia, utilizando el programa SAS.

Resultados y discusión

Producción de AIA mediante fermentación líquida

La producción de AIA a partir de *B. theobromae* se logró mediante la fermentación líquida en un medio rico en de hidratos de carbono. De acuerdo con la cuantificación de AIA obtenido por la cepa utilizada, se determinó que esta produce en promedio una concentración final de 125 ppm.

Investigaciones realizadas han demostrado que la cepa de *B. theobromae* tiene la capacidad de producir esta hormona, Castillo (2014) quien realizo un trabajo similar al de este trabajo con dos cepas de *B. theobromae* obtuvo valores diferentes de producción de 176 y 130 ppm de AIA. Lo que indica que la producción de AIA es influenciada por la capacidad que pueden tener las diferentes cepas de *B. theppbromae* para producir esta hormona.

Caracterización de Np

El tamaño de la Np ALG/QS presentaron valores de 123 ±23.5 nm, para las Np de ALG/QS/AIA de 247 ±26.6 nm y finalmente para las Np de ALG/QS/caldo los valores obtenidos fueron de 220 ±10.1 nm, lo que sugiere que posiblemente la adición de la hormona sintética, así como la adición del filtrado de caldo de fermentación no afecto la estructura de las Np, sin embargo, si aumento el tamaño en comparación con las Np no cargadas.

Este comportamiento se puede atribuir a la interacción que se dio entre los biopolímeros y las hormonas adicionadas, cuando el compuesto se mezcla con una solución de alginato a pH 7, adquiere una forma catiónica que interactúa fuertemente con el alginato cargado negativamente, se cree que la interacción iónica generada está contribuyendo a la disminución del tamaño y la dispersión (Cuadro 1) (Choe *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Valores obtenidos de tamaño de partícula, potencial Z, PH y peso de NP formadas por ALG/QS, ALG/QS/AIA Y ALG/QS/caldo.

Características	ALG/QS	ALG/QS/AIA	ALG/QS/CALDO
Tamaño (nm)	123 ± 23.5	247 ± 26.6	220 ± 10.1
Potencial zeta (mV)	-31.1 ± 0.57	-30.33 ± 2.3	-33.63 ± 4.09
pH	3.5 ± 0.26	3.13 ± 0.2	3.10 ± 0.26
Peso (g)	0.08 ± 0.01	0.1 ± 1.69	0.37 ± 0.46

±= desviación estándar; ALG/QS= alginato/quitosan; ALG/QS/AIA= alginato/quitosan/ácido indolacético; ALG/QS/caldo= alginato/quitosan/caldo microbiano.

La literatura menciona diferentes tamaños de Np de ALG/QS, utilizando la misma técnica; un ejemplo es lo reportado por Azevedo *et al.* (2014), quienes obtuvieron Np's con tamaños de 100-120 nm, mientras que Rampino *et al.* (2013), produjeron nano partículas de tamaño de 500 nm y 4000 nm las cuales muestran tamaños más grandes que los obtenidos en este trabajo. Esto pudo deberse a la interacción química con el alginato cargado negativamente.

El estudio de caracterización de las Np comprobó que en promedio los valores de potencial Zeta para las Np's de ALG/QS fue de -31.1 mV (Cuadro 1). La potencial zeta indica la estabilidad coloidal, tomando como referencia que las partículas con potencial Zeta por encima de +30 mV o por debajo de -30 mV generalmente se consideran estables (Silva *et al.*, 2011).

Las cargas se relacionan con los componentes que fueron utilizados en la producción de las Np, se tienen reportes de que el potencial Zeta negativo en Np de ALG/QS es debido a los grupos carboxilo del alginato de sodio, los cuales se encuentran ionizados a pH 4.9 (Costa *et al.*, 2015). En relación con la estabilidad química de los polímeros evaluados, el pH final de las Np's ALG/QS, ALG/QS/AIA y ALG/QS/CALDO fue de 3.5, 3.13 y 3.1 respectivamente, siendo estos valores similares entre ellos sin ningún cambio significativo, lo que indica la ausencia de hidrolisis de los sistemas utilizados.

La capacidad de las Np de ALG/QS para encapsular AIA así como el caldo de fermentación se evaluó a través de la determinación de la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga (CC). La EE de AIA en el Np fue de 90%, comportamiento similar se presentó en el estudio realizado por Zhang *et al.* (2010), quienes obtuvieron una EE entre 58 y 80%, mientras que Azevedo *et al.* (2014) obtuvieron 55% de EE.

Los altos niveles de eficiencia de encapsulación en biopolímeros con sustancias bioactivas y el menor tamaño de las Np obtenidas en este trabajo puede atribuirse a la interacción químicas que se presenta entre los iones de Ca²⁺ de las moléculas de alginato de sodio y quitosan (De Melo *et al.*, 2013).

Efectividad biológica

Los resultados obtenidos a partir de las mediciones morfométricas demostraron, que en relación con la variable de altura de planta los tratamientos mostraron una diferencia estadística contra el testigo absoluto, pero no entre ellos (Figura 1).

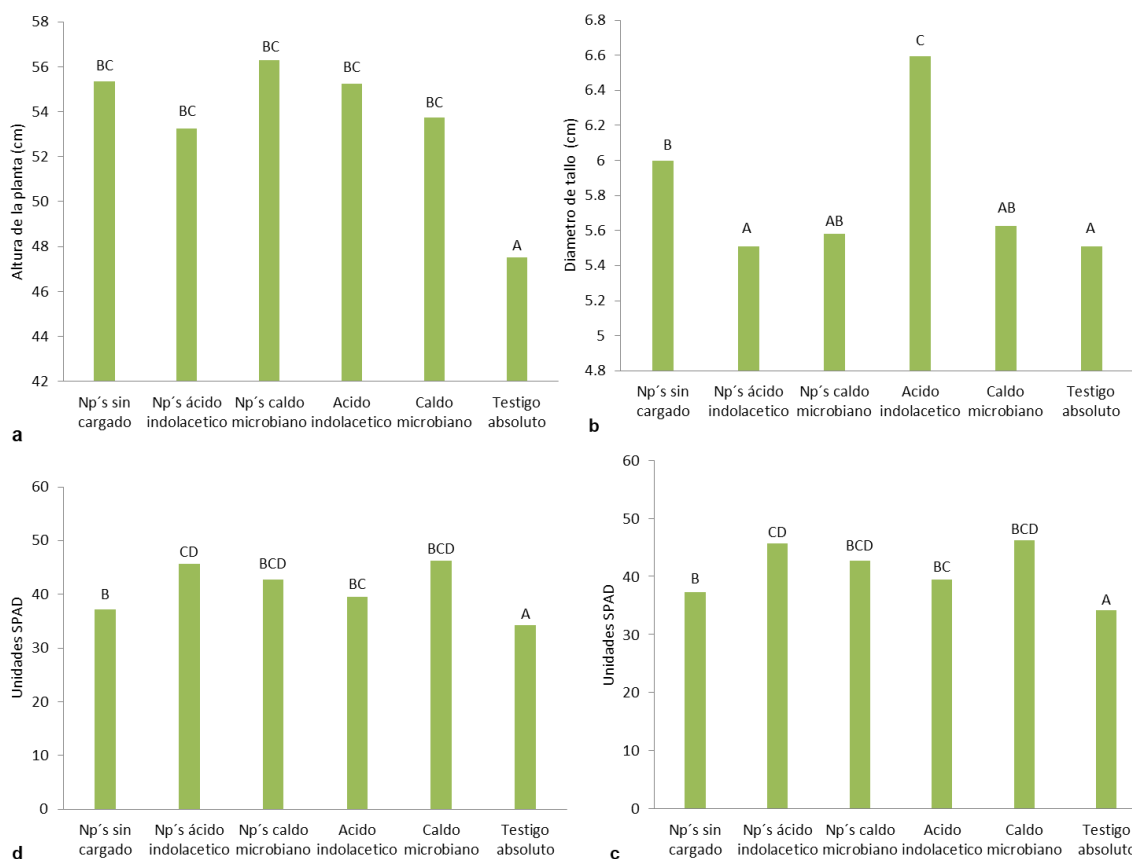


Figura 1. Actividad biológica de los diferentes tratamientos sobre plantas de tomate a los 45 días después de la primera aplicación de los tratamientos. a) altura de la planta; b) diámetro de tallo; c) número de hojas; y d) clorofila en hojas. El análisis estadístico utilizado fue Anova (Tukey, $p \leq 0.05$), donde valores con misma letra son estadísticamente iguales.

Todos los tratamientos indujeron una mayor altura en relación con el testigo absoluto, siendo el tratamiento de AIA grado reactivo el que otorga mayor altura numérica con un valor de 56.6 ± 3.3 cm seguido del Np cargadas con caldo microbiano y Np sin cargar con 55.3 ± 3.21 cm.

La mayor altura de planta obtenida en los tratamientos se atribuye a la aplicación de las auxinas, así como a los compuestos con posible actividad biológica no identificados presentes en el caldo microbiano, de igual manera se tienen reportes de que el CaCl_2 usado en la producción de las Np disminuye el estrés en plantas teniendo un incremento en la calidad y tamaño de estas (Santo-Pereira *et al.*, 2017).

Con respecto al diámetro de tallo se pudo observar que se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (Figura 1), siendo el tratamiento de AIA grado reactivo quien presentó un diámetro de tallo mayor al obtenido por el testigo absoluto teniendo este un diámetro de 5.52 ± 0.04 cm y el AIA grado reactivo 6.74 ± 0.34 cm.

El incremento observado por la aplicación exógena de AIA puede ser debido a que esta promueve el desarrollo y aceleración de la división celular en plantas (Xu *et al.*, 2012), en este sentido Hadi *et al.* (2010) observaron un aumento en el crecimiento de la planta, así como un aumento en la biomasa por la aplicación por aspersión de AIA. En cuanto a las Np, el aumento del diámetro puede atribuirse a la acción bioestimulante del alginato sobre varios procesos fisiológicos en las plantas, tales como: la elongación de raíces y la división celular (Hussein & Hamideldin, 2014).

En el caso de número de hojas, el análisis estadístico mostró diferencia significativa entre los tratamientos contra el testigo absoluto (Figura 1). De los tratamientos aplicados a las plantas de tomate, se demostró que el tratamiento de Np cargadas con caldo microbiano fue quien indujo una mayor producción de hojas en las plantas. En este sentido se ha reportado que el aumento de biomasa aérea puede ser estimulado para su potencialización con la aplicación exógena de diversas concentraciones de AIA en una amplia variedad de plantas (García-Corzo, 2015).

Para el caso de la clorofila en hojas, se observó diferencia estadística entre los tratamientos contra el testigo absoluto, mientras que entre los tratamientos el tratamiento con Np cargado de AIA reactivo fue quien produjo el mayor nivel de clorofila en las hojas con un valor de 48.82 ± 6.35 unidades SPAD. Esto puede ser debido a que la aplicación exógena de fitohormonas como el AIA acelera la actividad biológica, lo que ocasiona un aumento en la actividad fotosintética y un incremento en la clorofila de las hojas (Tucuch-Haas *et al.*, 2015).

Conclusiones

Mediante la fermentación líquida de *B. theobromae* se produjo AIA, el cual posteriormente fue utilizado de manera óptima como principio activo en la formación de Np de ALG/QS. La evaluación físico-química de las Np cargadas con AIA presentaron una estabilidad y un nivel de eficiencia de encapsulación superior al mencionado por la literatura, de igual forma la evaluación de eficiencia biológica en condiciones controladas para el desarrollo de plantas de tomate presentaron resultados superiores con respecto al tratamiento testigo utilizado, demostrando que la aplicación de nanosistemas cargados con bioestimulantes de origen microbiano resultan beneficiosos en el incremento de parámetros morfológicos de hortalizas de interés comercial.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para la realización de este trabajo; así como, al laboratorio de micología y biotecnología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por facilitar las cepas de *B. theobromae*. Al centro de investigación en química aplicada por proporcionar las instalaciones del laboratorio de microbiología. En el presente estudio, todos los autores declaran y aceptan que no hay conflicto de intereses. Y están de acuerdo con la publicación de este trabajo en su totalidad.

Literatura citada

- Agrawal, S. and Rathore, P. 2014. Nanotechnology pros and cons to agriculture: a review. *Int. J. Curr. Microbiol App. Sci.* 3(3):43-55. <https://pdfs.semanticscholar.org/e24b/0e62cce6e999de300dfae93125ae61417655.pdf>.
- Andolfi, A.; Maddau, L.; Cimmino, A.; Benedetto, T.; Basso, S.; Deidda, A.; Sierra, S. and Evidente, A. 2014. Lasiojasmonates A-C, three jasmonic acid esters produced by *Lasioidiplodia* sp., a grapevine pathogen. *Fitoquímica.* 103:145-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.016>.
- Anguiano-Cabello, J. C.; Flores-Olivas, A.; Ochoa-Fuentes, Y. M.; Arredondo-Valdés, R. and Olalde-Portugal, V. 2017. Fast detection of auxins by microplate technique. *Am. J. Plant Sci.* 8(2):171-177. Doi:10.4236/ajps.2017.82013.
- Armendáriz-Barragán, B.; Zafar, N.; Badri, W.; Galindo-Rodríguez, S. A.; Dounia-Kabbaj, H. F. and Elaissari A. 2016. Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 13(8):1165-1175. Doi:10.1080/17425247.2016.1182487.
- Asbahani, E. I.; Miladi, A.; Badri, K; Sala, W.; Addi, M.; Casabianca, E. A. and Elaissari, A. 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. *Inter. J. Pharmaceutics.* 483(1-2):220-243. Doi: doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.
- Azevedo, M. A.; Bourbon, A. I.; Vicente, A. A. and Cerqueira, M. A. 2014. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *Int. J. Biol. Macromol.* Doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.05.036.
- Bakry, A. M.; Abbas, S.; Ali, B.; Majeed, H.; Abouelwafa, M. Y.; Mousa, A. and Liang, L. 2016. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews Food Sci. Food Safety.* 15(1):143-182. Doi.org/10.1111/1541-4337.12179.
- Campos, F. S.; Franco, A. C.; Oliveira, M. T.; Firpo, R.; Strelczuk, G.; Fontoura, F. E. and Silva, A. D. 2014. Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Veterinary microbiology.* 171(1-2): 182-188. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.03.012.
- Castillo, G.; Altuna, B.; Michelena, G.; Sánchez, J. y Acosta, M. 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología.* 27(27):137-142. <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/27/PDF/16-CUANTIFICACION.pdf>.
- Castillo, G.; Torrecillas, A.; Nogueiras, C.; Michelena, G.; Sánchez, J. and Acosta, M. 2014. Simultaneous quantification of phytohormones in fermentation extracts of *Botryodiplodia theobromae* by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *World J. Microbiol Biotechnol.* 30(7):1937-1946. Doi:10.1007/s 11274-014-1612-5.
- Costa, J. R.; Silva, N. C.; Sarmiento, B. and Pintado, M. Potential chitosan-coated alginate nanoparticles for ocular delivery of daptomycin. 2015. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34(6):1255-1262. Doi:10.1007/s10096-015-2344-7.
- De Melo, N. F. S.; Campos, E. V. R.; de Paula, E.; Rosa, A. H. and Fraceto, L. F. 2013. Factorial design and characterization studies for articaine hydrochloride loaded alginate/chitosan nanoparticles. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 2(2):146-152. Doi:10.1166/jcsb.2013.1048.
- Eng, F.; Gutiérrez, M. y Favela, E. 2008. Estudio del efecto de la relación carbón: nitrógeno, el tipo tipo de inóculo y la adición de extracto de levadura en la producción de ácido jasmónico con *Botryodiplodia theobromae* Pat. Cepa RC1. *Rev. Iberoam. Micol.* 25(3):188-192. <http://dx.doi.org/10.1016/S1130-1406>.

- García-Corzo, P. G. 2015. Evaluación de ácidos idolacético e indolbutírico y extracto de algas marinas sobre el desarrollo de follaje de xate jade (*Chamaedorea oblongata*). Universidad Rafael Landívar. Tesis de licenciatura. 53 p. <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2015/06/17/Garcia-Pablo.pdf>.
- Hadi, F.; Bano, A. and Fuller, M. P. 2010. The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (*Zea mays* L.): the role of plant growth regulators (GA₃ and IAA) and EDTA alone and in combinations. *Chemosphere*. 80(4):457-462.
- Hussein, O. S. and Hamideldin, N. A. H. L. A. 2014. Effects of spraying irradiated alginate on *Solanum tuberosum* L. plants: Growth, yield and physiological changes of stored tubers. *J. Agric. Veterinary Sci.* 7(1):75-79. Doi:10.9790/2380-07117579.
- Jia, Z.; Dumont, M. J. and Orsat, V. 2016. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*. 15:87-104. Doi:10.1016/j.fbio.2016.05.007.
- Lugo-Medina, E.; García-Gutiérrez, C. y Ruelas-Ayala, R. D. 2010. Nanotecnología y nanoencapsulación de plaguicidas. *El fuerte México. Rev. Soc. Cult. Des. Sust.* 6(1):63-67. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46112896009>.
- Michelena, G.; Carrera, E.; Bell, A.; Altura, B. y Almeida, G. 2001. Proceso de separación y decoloración del ácido jasmónico a partir de *Botryodiplodia theobromae* cepa 715. *IMIQ*. 16(1):12-19. <http://www.redalyc.org/pdf/482/48216103.pdf>.
- Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S. and Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* 1:1806-1815. Doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.265.
- Nuruzzaman, M.; Rahman, M. M.; Liu, and.; Naidu, R. 2016. Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *J. Agric. Food Chem.* 64(7):1447-1483. Doi: 10.1021/acs.jafc.5b05214.
- Rademacher, W. 2015. Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *J. Plant Growth Regul.* 34(4):845-872. Doi:10.1007/s00344-015-9541-6.
- Rampino, A.; Borgogna, M.; Blasi, P.; Bellich, B. and Cesàro, A. 2013. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *Int. J. Pharm.* 455(1-2):219-228. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.034.
- Rohwer, C. and Erwin, J. 2010. Spider mites (*Tetranychus urticae*) perform poorly on and disperse from plants exposed to methyl jasmonate. *Entomol. Exp. Appl.* 137(2):1-10. Doi: 10.1111/j.1570-7458.2010.01043.x.
- Sarmiento B, Ferreira D, Veiga F, and Ribeiro A. 2006. Characterization of insulin-Loaded Alginate Nanoparticles Produced by Ionotropic Pre-Gelation Through DSC and FTIR studies. *Carbohydr. Polym.* 66:1.7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.008>.
- Santo-Pereira, A. E.; Silva, P. M.; Oliveira, J. L.; Oliveira, H. C. and Fraceto, L. F. 2017. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 150:141-152. Doi:10.1016/j.colsurfb.2016.11.027.
- Silva, M. S.; Cocenza, D. S.; de Melo, N. F. S.; Grillo, R.; Rosa, A. H and Fraceto, L. F. 2011. Alginate nanoparticles as a controlled release system for clomazone herbicide. *Química Nova*. 33(9):1868-1873. Doi: 10.1590/S0100-40422010000900009.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Anuario Estadístico de la Producción Agrícola del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). <http://infosiap.siap.gob.mx/agricola-siap-gb/identidad/index.jsp>.

- Terry, E.; Ruiz, J. y Díaz M. 2010. Respuesta del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicon* L.) a la aplicación foliar de un bioestimulante derivado del Vermicompost. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 14(41):27-32. <http://www.utm.mx/edi-antiores/temas41/2notas-41-1.pdf>.
- Tucuch-Haas, C. J.; Alcántar-González, G. y Larqué-Saavedra, A. 2015. Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de raíz y biomasa total de plántulas de trigo. *Terra Latinoam*. 33(1):63-68. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792015000100063.
- Wohlfart, S.; Khalansky, A. S. and Gelperina, S. 2011. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. *PLoS One*. 6(5):1-8. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0019121.
- Xu, Y.; Zhang, Y.; Li, Y.; Li, G.; Liu, D.; Zhao, M. and Cai, N. 2012. Growth promotion of *Yunnan pine* early seedlings in response to foliar application of IAA and IBA. *Inter. J. Mol. Sci*. 13(5):6507-6520. Doi:10.3390/ijms13056507.
- Zhang, N.; Li, J.; Jiang, W.; Ren, C.; Li, J.; Xin, J. and Li, K. 2010. Novel piezoelectric pump with 'E'-shaped valve found from sub-experiments. *Int. J. Pharm*. 5(2):212-218.