

La biofortificación foliar con hierro mejora la calidad nutracéutica y la capacidad antioxidante en lechuga

Foliar biofortification with iron improves nutraceutical quality and antioxidant capacity in lettuce

Pablo Preciado-Rangel¹, Ana Alejandra Valenzuela-García²,
Laura Andrea Pérez-García¹, Uriel González-Salas², Sergio Arturo Ortiz-Díaz¹,
Alain Buendía-García³ y Edgar Omar Rueda Puente^{4*}

¹ Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Torreón. Antigua Carretera Torreón-San Pedro km 7.5, ejido Ana. 27170 Torreón, Coahuila, México.

² Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango. Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo km 32, ejido Venecia. 35000 Gómez Palacio, Durango, México.

³ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez km 1.5 y Carretera a Santa Fe s/n. 27059 Torreón, Coahuila, México.

⁴ Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro. 83000 Hermosillo, Sonora, México.

* Autor para correspondencia (erueda04@santana.uson.mx)

RESUMEN

El hierro (Fe), es un oligoelemento indispensable para la salud humana y su deficiencia afecta a 1200 millones de personas en el mundo. La biofortificación agronómica puede mitigar esta deficiencia ya que su aplicación en los cultivos mejora la biosíntesis de compuestos bioactivos y propicia su bioacumulación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación foliar de Fe (FeSO_4) sobre el rendimiento, biosíntesis de compuestos bioactivos y acumulación en lechuga. Para ello cinco tratamientos fueron aplicados vía foliar: 0, 10, 20, 30 y 35 $\mu\text{M L}^{-1}$. En la cosecha, se cuantificó la calidad nutracéutica y la acumulación de Fe en hojas, así como la productividad de la planta de lechuga. La biofortificación con Fe modificó positivamente la biosíntesis de compuestos fitoquímicos y su concentración en hojas de lechuga, sin afectar el rendimiento. La aspersión foliar de Fe es una alternativa para incrementar la biosíntesis de compuestos fitoquímicos e incrementar la concentración de este elemento en lechuga.

Palabras clave: compuestos fitoquímicos, *Lactuca sativa*, rendimiento.

SUMMARY

Iron (Fe) is an essential trace element for human health and its deficiency affects 1.2 billion people in the world. Agronomic biofortification can mitigate this deficiency as its application in crops improves the biosynthesis of bioactive compounds and promotes their bioaccumulation. Our research aims to evaluate the effect of the foliar application of Fe (FeSO_4) on the yield, biosynthesis of bioactive compounds and accumulation in lettuce. For this, five treatments were applied by foliar route: 0, 10, 20, 30 and 35 $\mu\text{M L}^{-1}$. At harvest, the nutraceutical quality and the accumulation of Fe in leaves were quantified, as well as the productivity of the lettuce plant. Biofortification with Fe positively modified the biosynthesis of phytochemical compounds and their concentration in lettuce leaves, without affecting the yield. Fe foliar spraying is an alternative to increase the biosynthesis of phytochemical compounds and increase the concentration of this element in lettuce.

Index words: phytochemicals, *Lactuca sativa*, yield.

Cita recomendada:

Preciado-Rangel, P., Valenzuela-García, A. A., Pérez-García, L. A., González-Salas, U., Ortiz-Díaz, S. A., Buendía-García, A. y Rueda Puente, E. O. (2022). La biofortificación foliar con hierro mejora la calidad nutracéutica y la capacidad antioxidante en lechuga. *Terra Latinoamericana*, 40, 1-7. e1060. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1060>

Recibido: 16 de octubre de 2021. Aceptado: 29 de enero de 2022.
Artículo. Volumen 40, febrero de 2022.

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un oligoelemento indispensable para la salud humana, que juega un papel importante en una amplia variedad de procesos metabólicos, incluido el transporte de oxígeno, síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), síntesis de enzimas y transporte de electrones. La deficiencia de Fe y zinc afecta a más de dos mil millones de habitantes en el mundo (Prasad y Shivay, 2020a), la deficiencia de Fe es la patología nutricional de mayor prevalencia en el mundo y afecta más de mil doscientos millones de personas (Camaschella, 2019). La deficiencia de este micronutriente es más frecuente en los países en desarrollo donde la alimentación depende principalmente de los alimentos de origen vegetal y se tiene poco acceso a alimentos de origen animal (Pasricha, Drakesmith, Black, Hipgrave y Biggs, 2013). Los infantes y mujeres embarazadas son los grupos más vulnerables de padecer anemia debido a la baja biodisponibilidad de Fe en su dieta (Cappellini, Musallam y Taher, 2020). La ingesta diaria recomendada de Fe varía según la etapa de crecimiento (0.27 a 10 mg día⁻¹ para niños y 11 a 27 mg día⁻¹ para adultos (Abbasifar *et al.*, 2020). Las alternativas utilizadas para mitigar esta situación incluyen el uso de suplementos de Fe y productos fortificados, no han logrado reducir la deficiencia de este oligoelemento, debido al costo de los productos (Tripathi y Mishra, 2020). La biofortificación agronómica se considera como una estrategia rentable y sostenible para minimizar las deficiencias de micronutrientes en la población (De Groote, Tessema, Gameda y Gunaratna, 2021); ya que tiene como objetivo mejorar las características agronómicas y aumentar el contenido de elementos esenciales en las partes comestibles de las plantas, mediante la aplicación de estos elementos vía edáfica, foliar o en solución nutritiva (Jha y Warkentin, 2020). La aplicación de los micronutrientes al follaje de los cultivos desde el punto de vista sustentable, tiene beneficios económicos puesto que es más fácil de implementar (Ramzan *et al.*, 2020). El hierro es uno de los micronutrientes esenciales que intervienen en muchos procesos metabólicos en la planta, como la respiración, la fotosíntesis, la asimilación de azufre (S) y nitrógeno (N) y biosíntesis de ADN, lípidos y hormonas (Malhotra, Pandey, Sharma y Bindraban, 2020). Además, Fe también juega un papel importante

en la regulación de las actividades de catalasas y peroxidasas que tienen papeles esenciales en mecanismos de defensa antioxidantes (Kumar, Tewari y Sharma, 2010). La clorosis férrica es un problema agrícola que reduce la productividad y calidad nutricional en las partes comestibles de las plantas, considerándose como de las principales causas de la deficiencia de Fe en las personas en el mundo. Por otro lado, la lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una de las hortalizas de hoja más cultivadas y consumidas en el mundo principalmente en fresco y es ingrediente base de muchas ensaladas (SIAP, 2018); muy apreciado por sus propiedades organolépticas y es una buena fuente de minerales, vitaminas y compuestos con actividad antioxidante (Kim, Moon, Tou, Mou y Waterland, 2016). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la aplicación foliar de Fe en tres aspectos del cultivo de lechuga: contenido mineral foliar, características macro nutricionales, calidad nutracéutica y rendimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal y Tratamientos

Semilla de lechuga (*Lactuca sativa* L.) "Parris Island cos" de Heirloom Seeds® fueron germinadas en placas de foamy agrícola, 40 días después de la siembra las plántulas se trasplantaron en un sistema hidropónico NFT y la nutrición del cultivo se realizó utilizando la solución nutritiva Steiner (Steiner, 1961). Los tratamientos evaluados consistieron en la aplicación foliar de sulfato de hierro (FeSO₄ 7H₂O, Sigma-Aldrich®): 0, 20, 25, 30 y 35 μM L⁻¹, utilizando agua destilada como diluyente y un surfactante comercial no tóxico (INEX-A®, 2 mL L⁻¹). Las aplicaciones foliares se realizaron con aspersores manuales durante las primeras horas de la mañana, en total se realizaron tres aspersiones cada 15 días después del trasplante.

Muestreo

Las lechugas se cosecharon a 60 días después del trasplante, se midieron y se pesaron para determinar el crecimiento total y el rendimiento total del cultivo. Al mismo tiempo, se recolectaron muestras para cuantificar las variables bioquímicas y el contenido de Fe, obteniendo cinco muestras por cada tratamiento.

Rendimiento

Para determinar el peso fresco (rendimiento del cultivo), las cabezas de lechuga se cosecharon y se pesaron en una balanza analítica (Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA).

Análisis del Contenido de Nutrientes

El contenido de micronutrientes se determinó mediante digestión triácida. Se pesó un gramo de cada muestra en una balanza analítica (HR-120), con una precisión de 0.0001 g. Luego se colocó la muestra en un vaso de precipitados de 250 mL con perlas hirviendo y se agregaron 25 mL de mezcla triácida (1 L de HNO₃, 100 mL de HCl, 25 mL de H₂SO₄). Después de esto, la muestra se colocó en una parrilla de digestor en una campana extractora durante una hora. Al final, las muestras resultantes se filtraron en matraces aforados de 50 mL (solución madre), se calibraron y se agitaron con agua triple destilada. Finalmente, las muestras se vertieron en tubos de 50 mL para centrifugarlas. Las concentraciones de Zn, Mn, Cu, Fe se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS, iCE 3000 Series, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), y los resultados se expresaron en mg L⁻¹. Los macronutrientes (K, Ca y Mg) se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS, iCE 3000 Series, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), informando la concentración en porcentaje. El fósforo (P) se determinó mediante el método colorimétrico de metavanadato de amonio (NH₄VO₃) en un rango de absorción de 430 nm frente a una curva de calibración de K₂HPO₄. En total, se agregaron a los tubos de ensayo 3.5 mL de agua destilada, 500 L de la solución madre y 1 mL de reactivo de fósforo (P). Cada tubo se agitó en un vórtice y se dejó reposar durante una hora. Al final, la lectura se realizó en un espectrofotómetro de luz visible (espectrofotómetro, Genesis 10s UV / Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La concentración de P se expresó como porcentaje.

Compuestos Bioactivos

Para los extractos etanólicos, se molieron 100 g de pulpa de lechuga fresca por tratamiento y se utilizaron

para evaluar la calidad nutracéutica de la lechuga. Se colocó 1 g de muestra en un tubo Falcon de 15 mL y se agregaron 10 mL de grado reactivo de etanol. Después de 1 min de agitación en Vortex, se dejaron reposar durante 24 h. Los extractos etanólicos se decantaron posteriormente a 3500 rpm, y el sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El contenido fenólico total se determinó mediante una modificación del método de Folin-Ciocalteu (García-Nava, 2009¹). Se tomaron 150 µL de extracto etanólico, se diluyeron en 3 mL de agua (milli-Q), se agregaron 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), se agitó y se dejó reaccionar durante 3 min. Posteriormente se añadieron 750 µL de Na₂CO₃ (20%) y 950 µL de agua (milli-Q). Se dejó reposar la solución durante 2 h y se cuantificaron las muestras en un espectrofotómetro UV-Vis a 760 nm. El patrón se preparó con ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg GAE/100 g⁻¹ de peso fresco.

Los flavonoides totales se determinaron mediante colorimetría (García-Nava, 2009¹). Se tomaron 200 µL de extracto etanólico, se mezclaron con 1.25 mL de agua (milli-Q) y 75 µL de NaNO₂ (5%). Después de 5 min de reposo, se agregaron 150 µL de AlCl₃. Posteriormente, se añadieron 500 µL de NaOH (1 M) y 275 µL de agua (milli-Q). Se agitó vigorosamente y las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro UV-Vis a 510 nm. El estándar se preparó con quercetina disuelta en etanol absoluto ($y = 0.0122x - 0.0067$; $r^2 = 0.965$). Los resultados se expresaron en mg QE/100 g⁻¹ de peso fresco.

La capacidad antioxidante total se midió mediante el método DPPH⁺ in vitro (Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 1995). Se preparó una solución de DPPH⁺ (Aldrich, St. Louis, MO, USA) en etanol, a una concentración de 0.025 mg mL⁻¹. Se mezclaron 700 µL de extracto etanólico con 1.300 µL de solución DPPH⁺, después de 30 min las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro UV-Vis a 517 nm. Los resultados se expresaron en µM equivalente en Trolox/100 g⁻¹ de peso fresco.

Análisis Estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento, considerándose

¹ García-Nava, M. A. (2009). *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales*. Memorias del programa del Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México: UAQ.

una planta como unidad experimental. Las variables respuesta fueron analizadas mediante un análisis de varianza para determinar las diferencias entre los tratamientos y donde se detectó diferencia significativa, se utilizó la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento

Los resultados indican que la aspersión foliar de hierro (Fe) en las dosis utilizadas no afectó significativamente el peso fresco de la lechuga (Cuadro 1), obteniéndose el mayor peso fresco de lechuga aquellas que fueron asperjadas foliarmente con $30 \mu\text{M L}^{-1}$, superando al resto de los tratamientos. Giordano *et al.* (2019) reportan un aumento en el peso fresco de *Lactuca sativa* L tratadas con Fe, en comparación con las plantas no tratadas, de la misma manera, Cecílio-Filho, Mendoza, de Sordi y Urrestarazu (2015) en *Cichorium intybus* utilizando dosis crecientes de Fe, encontraron que la altura de la planta, el número de hojas, así como el peso fresco de la planta reducían a medida que aumentaba la concentración de Fe. Los resultados anteriores y a pesar de que el Fe es un elemento clave en crecimiento y muchos procesos fisiológicos de las plantas, también participa en la reacción de Fenton, que consiste en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales causan destrucción celular, porque reaccionan con grasas poliinsaturadas ácidos, proteínas y ácidos nucleicos (Briat, Dubos y Gaymard, 2015; Przybysz,

Wrochna, Małeczka, Gawrońska y Gawroński, 2016), probablemente esta sea el motivo de que disminuya el rendimiento como lo señala Giordano *et al.* (2019), quienes reportaron una disminución en el rendimiento de *Lactuca sativa* L, al aumentar las dosis de Fe; sin embargo, en nuestro trabajo no se observaron síntomas de toxicidad ya que el umbral de toxicidad puede variar entre especies, lo anterior significa que las dosis utilizadas en este trabajo están dentro de los rangos adecuados.

Análisis Nutricional

El contenido de nutrimentos en la parte comestible de los cultivos determina el contenido de minerales que proporcionará al ser humano cuando estos sean consumidos (Guillén-Molina *et al.*, 2016). En el presente estudio, se observó un incremento en el contenido foliar de N, P en las hojas de lechuga tratadas con $20 \mu\text{M L}^{-1}$ y en el caso de Fe, el contenido de este micro nutrimento estuvo influenciado por la dosis utilizada; las mayores dosis aplicadas promovieron una acumulación de Fe en las hojas de lechuga, sin efectos significativos en el resto de los nutrimentos (Cuadro 2). Para el caso de elementos como Mn, Zn, se ha reportado efectos antagónicos entre el Fe y estos micronutrientes (Ghasemi-Fasaei y Ronaghi, 2015), en el presente trabajo si se presenta este efecto, pero sin existir diferencias significativas por los incrementos del Fe asperjado. Se ha señalado una relación positiva entre el contenido de nitrógeno y la suplementación con Fe (Cakmak, Pfeiffer y McClafferty, 2010), pues

Cuadro 1. Efecto de la aplicación foliar de FeSO_4 en el rendimiento y sus componentes en el cultivo de lechuga.

Table 1. Effect of the foliar application of FeSO_4 on the yield and its components in the lettuce crop.

FeSO_4	Peso fresco total	Peso fresco de raíz	Peso fresco de cabeza	Número de hojas	Altura	Diámetro
$\mu\text{M L}^{-1}$	g				cm	
0	568.20a*	179.93a	388.26a	54.14a	26.66a	42.66a
20	654.73a	256.00a	398.73a	55.25a	29.33a	35.66a
25	783.27a	226.67a	556.6a	54.66a	28.66a	42.33a
30	816.53a	255.00a	561.53a	56.33a	34.02a	39.66a
35	656.87a	208.93a	447.93a	49.66a	22.57a	37.89a

*Valores promedio en columna con diferente literal son significativamente diferentes (Tukey $P \leq 0.05$).

*Mean values in columns with different literals are significantly different (Tukey $P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Contenido mineral foliar total en el cultivo de lechuga, por efecto de la aplicación foliar de FeSO₄.
Table 2. Total foliar mineral content in the lettuce crop due to the foliar application of FeSO₄.

FeSO ₄	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn
μM L ⁻¹	- - - - - % - - - - -					- - - - - mg L ⁻¹ - - - - -		
0	2.328d	0.302bc	13.15a	0.489a	0.113a	78.62c*	140.01a	35.16a
20	3.478a	0.404a	11.26a	0.597a	0.118a	131.53b	130.31a	45.31a
25	2.609c	0.303bc	8.53a	0.593a	0.123a	152.93b	150.47a	25.82a
30	2.762b	0.326b	11.34a	0.522a	0.148a	157.97b	168.66a	34.96a
35	2.630c	0.2756c	12.22a	0.644a	0.176a	212.89a	123.09a	38.52a

*Valores promedio en columna con diferente literal son significativamente diferentes (Tukey $P \leq 0.05$).

*Mean values in columns with different literals are significantly different (Tukey $P \leq 0.05$).

bajo una adecuada nutrición nitrogenada y la aspersión foliar con Fe aumenta la absorción de N, P y Fe en el tejido vegetal (Aciksoz, Yazici, Ozturk y Cakmak, 2011), en relación con el P, Guillén-Molina *et al.* (2016) señala que la aspersión foliar con Fe aumenta el P en el tejido y dosis excesivas lo disminuyen. El mayor contenido de Fe en la parte comestible de la planta también se ha reportado con la aspersión foliar de Fe con una dosis que fluctúa entre 20 y 50 μM en *Phaseolus vulgaris* (Sida-Arreola, Sánchez, Ávila, Zamudio y Acosta, 2015), la fertilización foliar con Fe puede incrementar el contenido de Fe en cereales entre un 15 y 30% (Prasad y Shivany, 2020b). El Fe se encuentra en muchos alimentos, especialmente aquellos en el reino animal y, a menudo, estas fuentes

no son accesibles para personas de bajos ingresos; por lo tanto, la lechuga biofortificada con Fe es una buena alternativa por las implicaciones positivas que puede tener en la nutrición humana.

Compuestos Bioactivos

La aplicación foliar de Fe, promovió un aumento en la biosíntesis de compuestos bioactivos, obteniendo los valores más altos de estos metabolitos con la dosis de 30 μM L⁻¹ (Cuadro 3). Estos resultados son similares a los reportados por Przybysz *et al.* (2016) al indicar que la concentración y actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos aumenta con el contenido de Fe de las plantas; estos metabolitos

Cuadro 3. Efecto de la aplicación foliar de FeSO₄ en el contenido de compuestos fenólico (FEN), flavonoides (FLAV) y capacidad antioxidante (AA) en lechuga.

Table 3. Effect of the foliar application of FeSO₄ on the content of phenolic compounds (FEN), flavonoids (FLAV) and antioxidant capacity (AA) in lettuce.

FeSO ₄	FEN	FLAV	AA
μM L ⁻¹	mg GAE/100 g ⁻¹ PF	mg QE/100 g ⁻¹ PF	μM eq Trolox/100 g ⁻¹ PF
0	139.34c*	179.50d	92.57a
20	150.10bc	272.17c	106.07a
25	154.86b	319.78b	111.71a
30	178.53a	363.34a	112.61a
35	145.88bc	241.78c	95.57a

*Valores promedio en columna con diferente literal son significativamente diferentes (Tukey $P \leq 0.05$).

*Mean values in columns with different literals are significantly different (Tukey $P \leq 0.05$).

secundarios que tienen una gran actividad antioxidante y efectos beneficiosos contra las enfermedades crónicas enfermedades, como inflamación, diabetes y algunos tipos de cáncer (Kim *et al.*, 2016). La producción de alimento de origen vegetal con un alto contenido de compuestos fitoquímicos es deseable ya que estos compuestos aumentan la calidad nutricional de los alimentos (Schiavon, Nardi, Dalla y Ertani, 2020) y su consumo pueden mejorar la salud humana (Gupta y Gupta, 2017). El Fe es un cofactor en la producción de compuestos bioactivos con alta capacidad antioxidante (Porras-Loaiza y López-Malo, 2009), los cuales eliminan los radicales libres causantes de enfermedades cardiovasculares en el ser humano (Zapata-Vahos, Rojas, David, Gutiérrez y Castro, 2020). Se reporta que la aplicación de dosis bajas de Fe aumenta la acumulación de metabolitos secundarios, mejorando así el perfil funcional de hortalizas (Giordano *et al.*, 2019); en cambio concentraciones superiores a 500 mg kg⁻¹ causan toxicidad, lo que puede ocasionar daños asociados a la formación de especies reactivas de oxígeno, induciendo la actividad de enzimas antioxidantes como como ascorbato peroxidasa, además de daños a la membrana y deterioro irreversible de la estructura celular, el ADN y las proteínas (Marschner, 2011).

CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo, reafirma a través de los resultados obtenidos, que la biofortificación agronómica con hierro (Fe) aplicado vía foliar, favorece la calidad nutracéutica, capacidad antioxidante y concentración de Fe en lechugas, sin afectar el rendimiento. La dosis óptima que maximizó el rendimiento y la calidad nutracéutica, así como la concentración de consumo de Fe recomendada en la lechuga en este estudio fue 30 µM L⁻¹ de Fe (FeSO₄), ya que dosis más altas disminuyen el rendimiento y la biosíntesis de compuestos bioactivos en la lechuga.

Finalmente, la biofortificación foliar con Fe en la lechuga es una herramienta eficaz para aumentar el contenido de Fe y ayudar así a combatir la desnutrición por déficit de micronutrientes.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los datos están disponibles de los autores previa solicitud razonable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

FONDOS

No aplicable.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización y diseño: P.P.R. y E.O.R.P. Protocolo de laboratorio y supervisión: A.A.V.G. y L.A.P.G. Revisión resultados: U.G.S. S.A.O.D. y A.B.G. Escritura: P.P.R. y E.O.R.P. Revisión manuscrito: P.P.R. y E.O.R.P.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto Tecnológico de Torreón, Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y al Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora por las facilidades brindadas para el desarrollo del presente estudio.

LITERATURA CITADA

- Abbasifar, A., Shahrabadi, F., & ValizadehKaji, B. (2020). Effects of green synthesized zinc and copper nano-fertilizers on the morphological and biochemical attributes of basil plant. *Journal of Plant Nutrition*, 43(8), 1104-1118. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1724305>
- Aciksoz, S. B., Yazici, A., Ozturk, L., & Cakmak, I. (2011). Biofortification of wheat with iron through soil and foliar application of nitrogen and iron fertilizers. *Plant Soil*, 349, 215-225. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0863-2>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Briat, J. F., Dubos, C., & Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Science*, 20(1), 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.005>
- Cakmak, I., Pfeiffer, W. H., & McClafferty, B. (2010). Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chemistry*, 87(1), 10-20. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-87-1-0010>
- Camaschella, C. (2019) Iron deficiency. *Blood*, 133(1), 30-39. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-815944>
- Cappellini, M. D., Musallam, K. M., & Taher, A. T. (2020) Iron deficiency anaemia revisited. *Journal Internal Medicine*, 287(2), 153-170. <https://doi.org/10.1111/joim.13004>
- Cecilio-Filho, A. B., Mendoza-Cortez, J. W., de Sordi, D., & Urrestarazu, M. (2015). Common chicory performance as influenced by iron concentration in the nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 38(10), 1489-1494. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.983609>
- De Groote, H., Tessema, M., Gameda, S., & Gunaratna, N. S. (2021). Soil zinc, serum zinc, and the potential for agronomic biofortification to reduce human zinc deficiency in Ethiopia. *Scientific Reports*, 11(1), 8770. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88304-6>
- Ghasemi-Fasaei, R., & Ronaghi, A. (2015). The influence of iron chelate and zinc sulfate on the growth and nutrient composition of chickpea grown on a calcareous soil. *Iran Agricultural Research*, 34(2), 35-40. <https://doi.org/10.22099/IAR.2016.3427>
- Giordano, M., El-Nakhel, C., Pannico, A., Kyriacou, M. C., Stazi, S. R., De Pascale, S., & Roupael, Y. (2019). Iron biofortification of red and green pigmented lettuce in closed soilless cultivation impacts crop performance and modulates mineral and bioactive composition. *Agronomy*, 9(6), 290. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060290>
- Guillén-Molina, M., Márquez-Quiroz, C., de la Cruz-Lázaro, E., Velázquez-Martínez, J. R., Soto-Parra, J. M., García-Carrillo, M., & Orozco-Vidal, J. A. (2016). Biofortificación de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) con hierro y zinc. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 17, 3427-3438.
- Gupta, M., & Gupta, S. (2017). An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2074. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02074>
- Jha, A. B., & Warkentin, T. D. (2020). Biofortification of pulse crops: Status and future perspectives. *Plants*, 9(1), 73 (1-29). <https://doi.org/10.3390/plants9010073>
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Kumar, P., Tewari, R. K., & Sharma, P. N. (2010). Sodium nitroprusside-mediated alleviation of iron deficiency and modulation of antioxidant responses in maize plants. *AoB plants*, 2010, plq002. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plq002>
- Malhotra, H., Pandey, R., Sharma, S., & Bindran, P. S. (2020). Foliar fertilization: possible routes of iron transport from leaf surface to cell organelles. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(3), 279-300, <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1616288>
- Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Cambridge, MA, USA: Academic press.
- Pasricha, S. R., Drakesmith, H., Black, J., Hipgrave, D., & Biggs, B. A. (2013). Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries. *Blood*, 121(14), 2607-2617. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-453522>
- Porrás-Loaiza, A. P., & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3, 121-134.
- Prasad, R., & Shivay, Y. S. (2020a). Agronomic biofortification of plant foods with minerals, vitamins and metabolites with chemical fertilizers and liming. *Journal of Plant Nutrition*, 43(10), 1534-1554. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1738464>
- Prasad, R., & Shivay, Y. S. (2020b). Fertilizers, grain quality, and nutrition-related human ailments: An overview. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90, 237-242. <https://doi.org/10.1007/s40011-018-1056-z>
- Przybysz, A., Wrochna, M., Małeczka-Przybysz, M., Gawrońska, H., Gawroński, S. W. (2016). Vegetable sprouts enriched with iron: Effects on yield, ROS generation and antioxidative system. *Scientia Horticulturae*, 203, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.017>
- Ramzan, Y., Hafeez, M. B., Khan, S., Nadeem, M., Rahman, S., Batool, S., & Ahmad, J. (2020). Biofortification with zinc and iron improves the grain quality and yield of wheat crop. *International Journal of Plant Production*, 14, 501-510. <https://doi.org/10.1007/s42106-020-00100-w>
- Schiavon, M., Nardi, S., Dalla-Vecchia, F., & Ertani, A., (2020). Selenium biofortification in the 21st century: Status and challenges for healthy human nutrition. *Plant and Soil*, 453(3), 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04635-9>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2018). *Lactuca sativa* L: tipos y variedades que se producen en México. Consultada el 02 de diciembre, 2019, desde <https://www.gob.mx/siap/articulos/lactuca-sativa-l-tipos-y-variedades-que-se-producen-en-mexico?idiom=es>
- Sida-Arreola, J. S., Sánchez-Chávez, E., Ávila-Quezada, G. D., Zamudio-Flores, P. B., & Acosta-Muñiz, C. (2015). Iron biofortification and its impact on antioxidant system, yield and biomass in common bean. *Plant Soil and Environment*, 61(12), 573-576. <https://doi.org/10.17221/643/2015-PSE>
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*, 15, 134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Tripathi, A., & Mishra, S. (2020). An Estimation of price effects of making food fortification mandatory in India. *Food and Nutrition Bulletin*, 41(3), 355-366. <https://doi.org/10.1177/0379572120938548>
- Zapata-Vahos, I. C., Rojas-Rodas, F., David, D., Gutiérrez-Monsalve, J. A., & Castro-Restrepo, D. (2020). Comparison of antioxidant contents of green and red leaf lettuce cultured in hydroponic systems under greenhouse, and conventional soil culture. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 73(1), 9077-9088. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v73n1.77279>