

EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y ANTIOXIDANTES EN LA PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicon* L. Mill) ENRIQUECIDA CON SELENIO

Rahim Foroughbakhch, Rocío Castillo Godina, Adalberto Benavides Mendoza, Jorge Alberto Villarreal Garza.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Fac. de Ciencias Biológicas rahim.forough@gmail.com,
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Depto. de Horticultura, adbemen@uaaan.mx

RESUMEN

La biofortificación tiene como finalidad incrementar la concentración de elementos biodisponibles en las plantas de cultivo para elevar la calidad nutricional. El selenio (Se) es un elemento traza de gran impacto para el metabolismo antioxidante de las plantas y su acumulación es pobre en especies como el tomate, de igual manera este elemento es esencial para los humanos. El propósito de este trabajo fue analizar la capacidad del selenito de sodio para incrementar la concentración de Se y modificar la actividad antioxidante en plantas de tomate. Para ello se aplicaron tres tratamientos 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenito de sodio (Na₂SeO₃) utilizando como vehículo el agua de riego, Se llevaron a cabo tres muestreos 40, 80 y 120 días después del trasplante y la subsecuente cuantificación de la acumulación de selenio y macronutrientes en hojas, tallos y frutos, así como su impacto en la producción de frutos bajo un diseño experimental completamente al azar. Se obtuvo una cuantificación del potencial oxido reducción y de la actividad de antioxidante específicos como la catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, el ácido ascórbico y licopeno, para cada variable así mismo la expresión de los genes *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* y *lic* en los frutos. Los resultados mostraron un incremento en la acumulación de Se, encontrándose hasta un 53.1% de aumento en la concentración en los frutos bajo el tratamiento 5 mg L⁻¹ en comparación con el testigo, la concentración de Se si influyó positivamente en los parámetros de calidad incluyendo el ácido ascórbico y el licopeno. La actividad de las enzimas antioxidantes aumentó notablemente en el fruto con el tratamiento 5 mg L⁻¹ de selenito encontrándose 60.9% de aumento para CAT, 33.4% para GPX y 26.0% para SOD. En cuanto la expresión génica hubo mayor nivel de transcritos de los genes *gpx*, *sod* y *apx* bajo el tratamiento 2 mg L⁻¹.

INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos saludables con alto contenido de nutrientes antioxidantes contribuye a la protección de las células del daño oxidativo y a la prevención de diversas enfermedades (Broadley et al. 2006). Los radicales libres provocan reacciones oxidativas en cadena que son eliminados por la acción del sistema antioxidante de defensa (Sahnoun et al. 1997), incluyendo enzimas tales como el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión peroxidasa (GPX), de esta manera, al activarse este sistema antioxidante de defensa, puede proporcionarles a las plantas una mayor tolerancia frente al estrés ambiental por consecuente la generación de frutos de calidad. Las enzimas antioxidantes generalmente usan elementos traza tales como selenio (Se) así mismos cofactores, como es el caso de la GPX (Arthur 2003). Se piensa que el selenio es un elemento asociado con el metabolismo antioxidante (Lin et al. 2012; Feng et al. 2013) a través de su papel como cofactor de selenoenzimas (Combs, 2001); su deficiencia podría inducir daños en el balance celular redox.

No se han establecido cuantitativamente los requerimientos por Se, más bien se han recomendado los niveles de ingesta en diferentes regiones del mundo. La ingesta recomendada por el National Research Council (1989) de los E.U.A es de 70 µg día⁻¹ para hombres y 55 µg día⁻¹ para mujeres; durante el embarazo y lactancia esta dosis se estima en 75 µg día⁻¹. Mientras que Combs (2001) y Broadley et al. (2006) recomiendan hasta 300 µg por día para reducir el riesgo de diversas enfermedades como el cáncer. En humanos, la referencia de consumo en promedio de Se es de 60 a 75 µg por día, de acuerdo con los datos proporcionados por el National Research Council (1980); sin embargo, estos valores se encuentran muy por debajo de los niveles de consumo citado por Combs (2001) y Broadley et al. (2006). Hay países donde la falta de selenio en los suelos ha provocado problemas de salud para el ganado y en casos extremos también en la población humana como lo son: Nueva Zelanda, Finlandia, parte de E.U.A como en Beltsville y en la provincia de Keshan China (Combs y Combs 1986). El consumo en Caracas, Venezuela s 3 veces más alto que

en Beltsville (Mondragón y Jaffé 1976). En Latinoamérica se observaron los valores más bajos de Se en Guatemala y moderadamente bajos de Ecuador y Brasil, mientras que muestras de Colombia, Venezuela y México poseen niveles superiores al promedio (Jaffé et al., 1969). En México las estadísticas de consumo señalan un valor promedio de 40 μg día⁻¹ (AMENAC 2009). Referente a la biodisponibilidad del Se, generalmente las plantas cultivadas que crecen en suelos no-seleníferos tienen bajas concentraciones de Se, que van de 0.01 a 1 mg kg⁻¹ peso seco. Así, en algunos países donde los suelos son pobres en selenio, este se agrega a los fertilizantes utilizados para la producción agrícola (Broadley et al. 2006). Con base en lo anterior se ha planteado como estrategia para la mejora de la ingesta de selenio el enriquecimiento de los cultivos alimenticios con este elemento. El objetivo principal del presente trabajo fue: generar los conocimientos básicos acerca de los cambios en la expresión génica y en la capacidad antioxidante de la planta de tomate al aplicar selenio como selenito de sodio. Dicha especie fue utilizada como modelo biológico por ser caracterizada como no acumuladora de selenio (White et al. 2004).

TEORIA

El tomate es una planta de porte arbustivo que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de manera rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado o de crecimiento ilimitado (Nuño et al. 2007) como indica la Figura 1.



Figura 1. Planta de tomate de crecimiento limitado e ilimitado respectivamente

El Nombre tomate proviene de tomatl, en la lengua náhuatl de México (Nuez 2001). Los antioxidantes son compuestos que permiten la vida celular en un ambiente oxidante y son los responsables de la eliminación de los radicales libres los cuales se producen, de manera natural, en los sitios de actividad energética celular. La función química de los antioxidantes es ceder potencial reductor a los compuestos oxidantes capaces de dañar a los componentes celulares (Benavides et al. 2009). Los organismos poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes regulables, enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, GSH peroxidasa, quinona reductasa y hemoxigenasa) y no enzimáticos (selenio, zinc, ácido ascórbico, α -tocoferol y carotenoides) que son los encargados de evitar estos factores (Murillo et al. 2007). Estas respuestas de defensa se desencadenan por factores bióticos tales como patógenos, plagas y simbiontes o por factores abióticos como alta o baja temperatura, radiación, salinidad, entre otros y no necesariamente en condiciones que originan estrés (Benavides et al. 2009).

El papel del selenio como un antioxidante en pastos sugiere que la adición al suelo puede mejorar la calidad del forraje, por la disminución de la senescencia y persistencia de la pastura (Cartes et al. 2005). Estudios realizados indican que este elemento se asocia a cambios en el estado redox celular, esto a su vez se relaciona con la habilidad de las plantas a tolerar el estrés ambiental. El selenio es un constituyente esencial de un número de enzimas, algunas de las cuales tienen funciones antioxidantes (Raymond 2002). Recientemente se ha demostrado que el selenio aumenta la capacidad antioxidante y la tolerancia al estrés en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y plantas de ballico (*Lolium perenne* L.) además en un estudio realizado aplicando selenio en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*), los resultados sugirieron que el Se es un antioxidante y que activa los

mecanismos de protección, que pueden curar el estrés oxidativo en los cloroplastos (Seppanen et al. 2003).

En general, los carotenoides han cobrado gran importancia debido a que son antioxidantes que neutralizan los radicales libres que dañan a las células, y de ellos, el licopeno es el que tiene las propiedades más sobresalientes. El tomate es una fuente importante de licopeno además de otros carotenoides como el β caroteno (Madhavi y Salunkhe 1998). Ambos, el licopeno y el β caroteno son importantes antioxidantes de defensa en contra de la peroxidación lipídica en las células (Agarwal et al. 2005). El licopeno (Figura 2) es un hidrocarburo alifático que pertenece a la familia de los carotenoides, tiene una estructura que consiste en una larga cadena de dobles enlaces conjugados con dos anillos extremos abiertos. La estructura del licopeno ($C_{40}H_{56}$, peso molecular: 536.85) es la más larga de los carotenoides; este hidrocarburo insaturado contiene 13 dobles enlaces carbono-carbono, de los cuales 11 están conjugados y dispuestos en una matriz lineal (Figura 3). Estos dobles enlaces conjugados son responsables del vibrante color rojo de licopeno (Clinton 1998). El licopeno es un compuesto lipófilo que es insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos y tiene una capacidad de extinción constante al doble que la del β caroteno y 10 veces mayor al α tocoferol (Hadley et al. 2003). La capacidad de extinción está directamente relacionada con la posición de los niveles de energía del estado excitado, que dependen de la longitud de la cadena doble de carbono conjugado (Young y Lowe 2001).

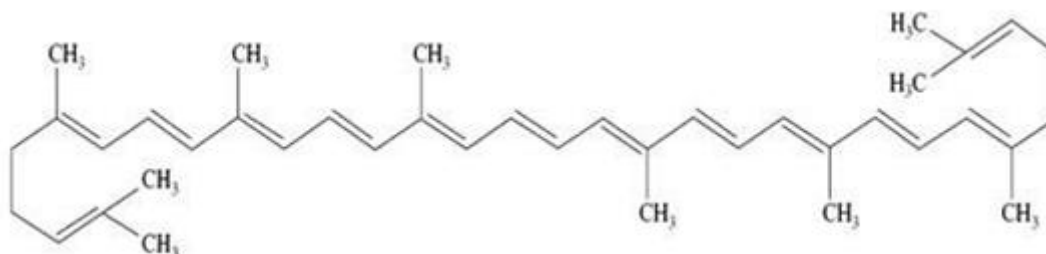


Figura 2. Estructura del licopeno

El selenio es un elemento mineral natural, distribuido en la naturaleza en la mayoría de las rocas y suelos; en forma pura existe en forma de cristales hexagonales de color gris metálico a negro, pero en la naturaleza generalmente esta combinado con sulfuro o con minerales de plata, cobre, plomo y níquel. Este mineral fue identificado como nuevo elemento químico en 1818 por J. J. Berzelius en Gripsholm, Suecia. Fue aislado del residuo color rojo producido durante la oxidación del dióxido de azufre proveniente de piritas de cobre para la producción de ácido sulfúrico (Terry et al.2000).

El Se es un elemento químico del grupo 16, encontrándose justo abajo del azufre en la tabla periódica, dándole así propiedades químicas similares a este último elemento (Cruz-Jiménez 2005), el selenio tiene variedad en sus estados de oxidación como seleniuro (Se^{2-}), selenio elemental (Se^0), selenito (Se^{4+}) y selenato (Se^{6+}). Las formas oxidadas del selenio (Se^{4+} y Se^{6+}) son absorbidas por las plantas debido a su elevada solubilidad, sin embargo, el Se^0 y el Se^{2-} son insolubles, por lo cual difícilmente son absorbidas por las plantas (Broadley et al. 2006).

El selenio (Se) se encuentra ampliamente distribuido entre los materiales de la corteza terrestre, aunque de forma poco uniforme (Magos y Berg 1988). En la mayoría de suelos las concentraciones de Se, varían entre 0.01 y 2 mg Kg⁻¹ (Mayland 1994), mientras que concentraciones elevadas de Se, se asocian generalmente a suelos formados a partir de materiales sedimentarios de origen marino (Presser 1994). Fordyce (2005) señala que en la mayoría de los suelos del mundo las concentraciones de selenio son bajas, alcanzando de 0.01 a 2.0 mg Kg⁻¹ y una media de 0.4 mg Kg⁻¹, aunque pueden encontrarse concentraciones >1200 mg Kg⁻¹, en suelos denominados seleníferos.

PARTE EXPERIMENTAL

Localización, siembra, establecimiento del experimento

El experimento se llevó a cabo en un invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Saltillo, Coahuila, México. El cual se encuentra localizado a una altura de 1743 msnm, entre los 25° 24' de latitud norte y 100° 02' de longitud oeste. Se sembraron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.). La siembra se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades, verificando el crecimiento y el respectivo cuidado de la plántula durante un periodo de 40 días. Se colocó una malla sombra de polipropileno color negro que tenía un factor de sombra de 25%. Además, en el área se colocaron termómetros y medidores de humedad relativa. La temperatura máxima y mínima y la humedad relativa fueron encontradas oscilando entre 18-25°C y 50-65%, respectivamente.

Se seleccionaron las plántulas de las más uniformes en tamaño y desarrollo, se sumergió el epellón en una solución enraizadora y se trasplantaron en las macetas de 20 L. El trasplante se realizó a los 40 días después de la siembra.

La nutrición del cultivo se llevó a cabo mediante la aplicación de la solución nutritiva universal Steiner (Steiner 1961), ajustada a un valor de pH de 5.5 a 6.5 con ácido sulfúrico, con el objetivo de asegurar la disponibilidad de los elementos minerales en la solución nutritiva y mantener el ión selenito en su forma protonada (Preciado- Rangel et al. 2006). La concentración de la solución aplicada fue acorde a la etapa fenológica: 25% en las etapas iniciales y alcanzando el 75% después de la floración. A las plantas se les aplicaron los siguientes tratamientos como se explica en el Cuadro 1, usando como fuente selenito de sodio anhidro grado reactivo (Na₂SeO₃ Sigma-Aldrich, 99% de pureza).

Al cabo de 40, 80 y 120 días después del trasplante se registraron para cada fecha la información sobre el tejido foliar, el tallo y el fruto, esto con el fin de poder realizar ciertos análisis morfométricos sobre los componentes de la planta.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados en una solución nutritiva de riego sobre el cultivo de la planta de tomate.

Tratamientos

T Testigo	Solución Steiner	+	0 mg L ⁻¹ de selenio
T 2 mg L ⁻¹	Solución Steiner	+	2 mg L ⁻¹ de selenio
T 5 mg L ⁻¹	Solución Steiner	+	5 mg L ⁻¹ de selenio

Producción y calidad de fruto: para la colecta de los frutos se tomó en cuenta una escala de clasificación de madurez de acuerdo con los estándares estadounidenses de coloración de tomates frescos, seleccionando aquellos denominados "red" según el United States Department of Agriculture (USDA 1997). Se cuantificó el peso de los mismos para obtener la producción de fruto por planta (PF) en g planta⁻¹.

De cada tratamiento, se eligieron 3 plantas completamente al azar y se etiquetaron desde el inicio del trasplante. De cada uno de los tres muestreos correspondientes se realizaron mediciones de la altura de la planta (ALT). La firmeza se midió utilizando un penetrómetro manual (QA Supplies, model FT011), se tomó firmemente el fruto y se introdujo el penetrómetro de un solo impulso hasta la marca delimitante de la puntilla de 8mm, se tomó la lectura y se reportó en kg cm⁻¹.

Sólidos solubles totales de frutos Para los frutos colectados se midió la cantidad de sólidos totales (SST). Se perforó cuidadosamente cada fruto para obtener una gota de jugo el cual se colocó en un refractómetro manual debidamente calibrado, se cerró la tapa suavemente de manera que la muestra cubriera completamente la superficie del prisma, se observó a través de la mirilla y se tomó la lectura en la intersección de los dos campos, los valores se reportaron en grados Brix.

Contenido de selenio y macronutrientes: De las muestras obtenidas para la estimación de materia seca total, se tomó una porción de 5 g y se maceró en un mortero de porcelana. Se tomó 1 g del macerado y esta muestra fue sometida a digestión ácida con ácido nítrico y perclórico en una proporción 3:1 usando una plancha de calentamiento a 100 °C. Posteriormente la solución fue filtrada con papel filtro Whatman (No 42 sin cenizas) y aforada a una solución de trabajo de 100 mL con agua desionizada. La lectura se realizó utilizando un espectrómetro de Inducción de Plasma (ICP) marca THERMO JARELL ASH, Modelo IRIS Advantage, siguiendo el procedimiento 984.27 de la

AOAC (2000). Los nutrientes cuantificados fueron K, Mg y Ca además de la correspondiente cuantificación de selenio.

Análisis de la expresión génica de frutos La extracción de ARN se llevó a cabo por el método del Trizol. La pastilla resultante se lavó con 500 μ L de etanol frío (70%), se centrifugó por 5 min a 7,500 g y 4°C, nuevamente, el sobrenadante fue removido y la pastilla restante en el fondo del tubo fue secada al aire durante 5 min. La pastilla se resuspendió con 50 μ L de agua DEPC y posteriormente incubada en baño de agua de 60°C durante 15 min para disolver el ARN. Finalmente, para que el ARN pudiera ser almacenado en condiciones de estabilidad, se alicuotó en 3 tubos de 500 μ L, conteniendo 20 μ L en cada uno de ellos, entonces se almacenó a -70°C. Se determinó la cantidad del ARN obtenido por medio de espectrofotometría UV-Vis (absorbancia 260/280) y la calidad por electroforesis desnaturalizante.

RESULTADOS

Producción del fruto

Cuadro 2. Números de fruto por planta (NF) y peso de frutos por planta (PF) en tomate con aplicación de tres tratamientos de selenio (0, 2 y 5 mg L⁻¹) en la solución nutritiva.

Tratamiento	Número de frutas/planta	Peso de frutas/planta (g)
0 mg L ⁻¹	12.00±2.9a	869.20±224.6a
2 mg L ⁻¹	17.67±3.9a	1061.53±349.8a
5 mg L ⁻¹	16.67±3.6a	1184.83±378.9a

Cuantificación de variables agronómicas y de calidad de frutos

Se registraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos asociados a la aplicación de Se en comparación con el tratamiento testigo, con un incremento significativo en los valores de longitud de tallo (ALT), diámetro de tallo (DT), sólidos solubles totales de fruto (SST), firmeza, diámetro de frutos (DP y DE), y el contenido de materia seca total (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Variables agronómicas y calidad de frutos evaluadas bajo la aplicación de selenio en solución nutritiva.

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Diámetro polar (cm)	Diámetro ecuatorial (fru)	Firmeza kg/ cm ²	Sólidos Solubles Tot
Control	61.1±3.9b*	11.8±0.9b	5.49±0.7b	5.42±0.5b	2.9±0.2c	4.3±0.1b
2 mg L ⁻¹	67.5±3.0a	13.4±0.8a	6.24±0.5a	5.93±0.3a	4.3±0.3b	5.1±0.4a
5 mg L ⁻¹	65.2±2.9a	13.3±0.8a	6.38±0.4a	5.96±0.7a	4.5±0.3a	4.9±0.6a

*Las medias seguidas de la misma literal no son diferentes según Tukey ($p \geq 0.05$).

Cuadro 4. Comparación de medias de la materia seca total (MST) bajo la aplicación de selenio en solución nutritiva

Tratamiento	Materia seca total (%)		
	Hoja	Tallo	Fruto
Control	43.7±14.5 b*	26.6±3.0 a	32.8±6.1 a
2 mg L ⁻¹	48.1±19.1 ab	28.3±3.6 a	28.9±4.5 a
5 mg L ⁻¹	50.9±19.2 a	29.9±6.5 a	30.0±4.9 a

Cuantificación de selenio y macronutrientes

La concentración de Se en los diferentes componentes de la planta expresada en $\mu\text{g g}^{-1}$, indicó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos. Referente a la distribución de Se en las plantas, se obtuvo más selenio en los tallos y menor concentración en los frutos y hojas (Figura 2).

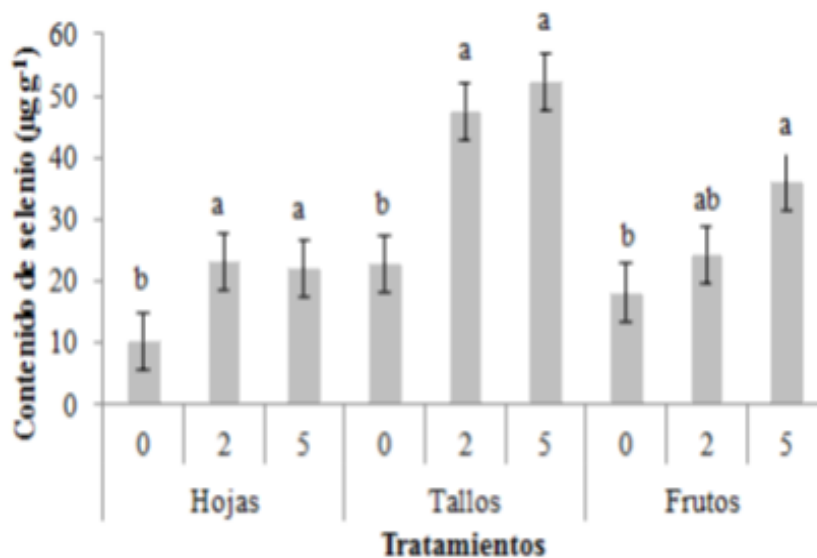


Figura 2. Concentración de selenio en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva.

Los contenidos de macronutrientes mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en componente tallos y frutos.

Las correlaciones entre la concentración de Se en los diferentes tejidos de la planta, fueron todas significativas (hoja/tallo, $r = 0.50$; hoja/fruto, $r = 0.68$; tallo/fruto, $r = 0.59$), lo que sugiere una ausencia de competencia por el Se entre los diferentes órganos y una acumulación de Se de los órganos en proporción directa a su disponibilidad (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración de macronutrientes y selenio en los diferentes órganos de la planta de tomate.

Órgano	Trat	N	P	K	Ca	Mg	Se
Hoja	0	3.36±0.66 ^a *	0.76±0.27 ^a	3.57±0.23 ^a	5.16±2.76 ^a	0.58±0.19 ^c	
	2		9.90±0.10 ^b				
	5	3.24±0.46 ^a	0.82±0.18 ^a	4.42±1.94 ^a	4.72±1.43 ^a	0.68±0.16 ^b	
Tallo	0	2.36±0.59 ^a	0.70±0.10 ^a	3.84±0.20 ^{ab}	3.30±1.68 ^a	0.49±0.16 ^a	
	2		21.7±0.12 ^b				
	5	2.50±0.50 ^a	0.77±0.19 ^a	4.47±1.47 ^a	3.90±1.64 ^a	0.31±0.06 ^a	
Fruto	0	2.20±0.42 ^a	0.59±0.03 ^a	2.95±0.56 ^{ab}	0.86±0.3 ^a	0.40±0.13 ^a	
	2	16.8±0.05 ^b					
	5	1.87±0.34 ^a	0.47±0.04 ^a	3.44±0.46 ^a	1.26±1.3 ^a	0.34±0.13 ^a	
		24.5±0.10 ^{ab}					
		2.11±0.45 ^a	0.56±0.15 ^a	2.90±0.55 ^b	2.82±0.03 ^a	0.33±0.15 ^a	
		35.8±0.14 ^a					

*Medias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$). Las concentraciones de N, P, K, Ca y Mg están dadas en porcentaje, el selenio en $\mu\text{g g}^{-1}$

Ácido ascórbico y licopeno En los frutos se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la variable AA además del aumento en los SST anteriormente señalado. Estos cambios positivos en la calidad se vieron acompañados por un aumento en la concentración de licopeno al aplicar 5 mg L-1 de Se (Cuadro 6).

Cuadro 6. Características químicas de los frutos de tomate de plantas con aplicación de selenio (0, 2 y 5 mg L-1) en la solución nutritiva. Los datos corresponden a frutos colectados a los 120 días.

Tratamiento (mgL^{-1})	Ácido ascórbico (mg)	Licopeno ($\mu\text{g g}^{-1}$)
0	1.20±0.20 ^b	13.81±2.4 ^b
2	2.82±0.09 ^a	20.34±5.1 ^b
5	2.41±0.10 ^a	41.71±6.2 ^a

Las medias seguidas de la misma literal no son diferentes según Tukey ($p > 0.05$). AA= ácido ascórbico; ddt = días después del trasplante.

Expresión genéica de los frutos

Los valores de densidad relativa de los frutos, en el caso de *gpx*, *sod* y *apx* con la aplicación de 2 mg L-1 y 5 mg L-1 de Se, encontraron con valores por debajo de 1, es decir con un nivel de expresión menor. La excepción fue el gen *gpx* que mostró aumento en su expresión con la mayor concentración de Se. Cabe señalar que se encontró una correlación de Spearman significativa ($R = 0.9636$, $\alpha \leq 0.05$) de la expresión del gen *cat* con respecto a la concentración de Se.

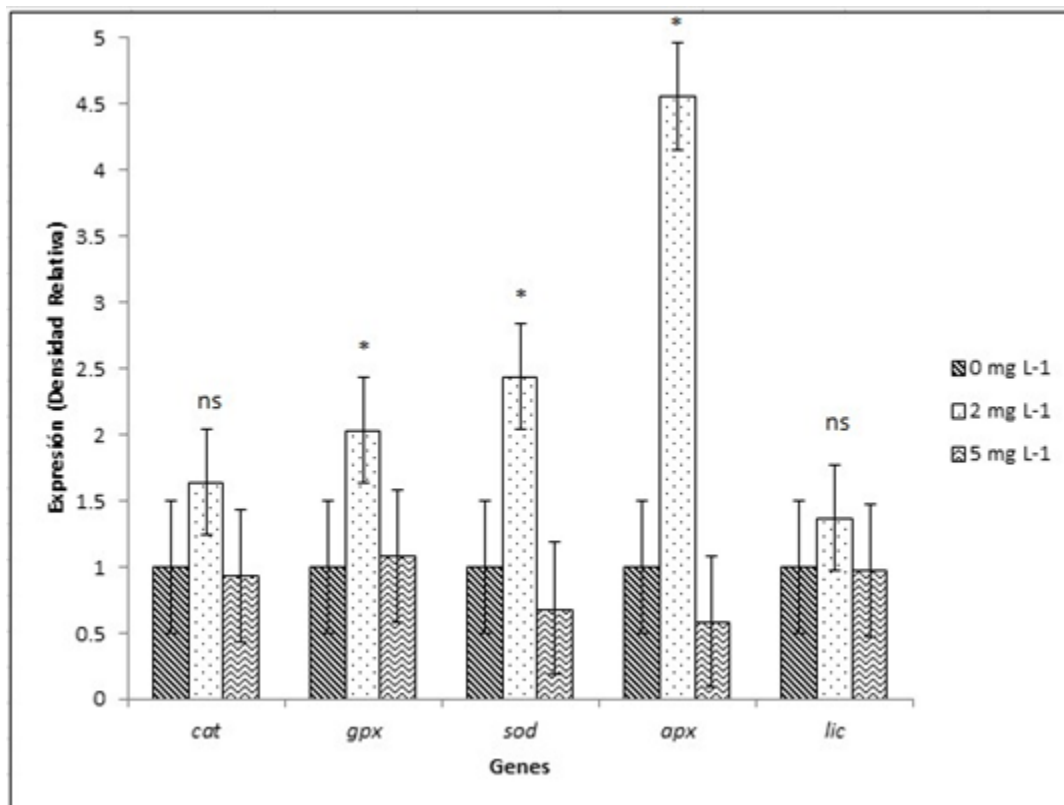


Figura 3. Nivel de expresión de genes de antioxidantes de frutos de tomate de plantas con aplicación de selenio 2 y 5 mg L⁻¹ y un tratamiento testigo (0 mg L⁻¹) en la solución nutritiva. Los valores mostrados indican la expresión relativa frente al testigo con un valor de 1. *cat*: gen catalasa; *gpx*: gen glutatión peroxidasa; *sod*: gen superóxido dismutasa; *apx*: gen ascorbato peroxidasa y *lic*: gen licopeno. ns= no significativo * Significativo (p<0.05).

CONCLUSIONES

Las variables de crecimiento, altura de la planta, diámetro de tallos, firmeza de frutos y sólidos solubles de frutos respondieron positivamente a la aplicación de selenio, mientras que esta aplicación no causó interferencia con la absorción de N, P, K, Ca y Mg. La adición de selenio en la solución nutritiva incrementó significativamente la concentración de este elemento en los diferentes órganos de la planta; el tratamiento 5 mg L⁻¹ permitió hasta el doble de la concentración de este elemento en frutos comparado con el tratamiento control. Esta concentración de selenio en frutos fue positivamente correlacionada con la concentración en hojas y tallos. Además, el Se resultó en un incremento en la actividad enzimática de catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en frutos con el mayor tratamiento aplicado (60.9, 33.4 y 26.0% de aumento respectivamente), a pesar que los análisis de marcadores de estrés oxidativo tales como peróxido de hidrógeno y/o peroxidación lipídica son necesarios para un mejor entendimiento de este cuadro antioxidante. Los frutos bajo ambos tratamientos de Se (2 y 5 mg L⁻¹) mostraron mayor acumulación de ácido ascórbico respecto al testigo y, en el caso del tratamiento de 5 mg L⁻¹ un 66.9 % más de licopeno. Por su parte, el mayor nivel de transcritos de los genes *gpx*, *sod* y *apx* ocurrió con el tratamiento de 2 mg L⁻¹. Los demás genes fueron expresados, aunque en un nivel menor.

BIBLIOGRAFIA

1. A. Agarwal, S. A. Prabakaran, T.M. Said. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology* 26(6), 2005, pp: 654-660.

2. A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 17th ed. 2000., Gaithersburg, M.D. USA.
3. J.R. Arthur. 2003. Selenium Supplementation: Does Soil Supplementation Help and Why?. *Proc. Nutr. Soc.* 62:393-397.
4. Benavides-Mendoza A, Ramírez H, Robledo-Torres V, Fuentes-Lara LO. 2009. Antioxidantes en las plantas. *Modernos de Nutrición Vegetal, A.C.*, pp. 13-26. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Texcoco, México.
5. M.R. Broadley, P.J. White, R.J. Bryson, M.C. Meacham, H.C. Bowen, S.E. Johnson, Biofortification of UK Food Crops with Selenium. *Proc. Nutr. Soc.* 65, 2006, pp: 169-181.
6. T.A. Brown, A. Shrift. Selenium; toxicity and tolerance in higher plants. *Biol. Rev.* 57, 1982, pp: 59-84.
7. P. Cartes, C. Shene. M. Mora. Selenium Distribution in Ryegrass and its Antioxidant Role as Affected by Sulfur Fertilization. *Plant Soil* 285, 2006 pp: 187-195.
8. G.F. Combs, S. Combs. *The Role of Seleniium in Nutrition.* Academic Press, New York, 1986, 342 p.
9. G.F. Combs. Selenium in Global Food Systems. *Brit. J. Nutr.* 85:17-547. COVECA (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria). 2010. Monografía del tomate rojo. <http://faostat.fao.org>.
10. F. Fordyce. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: *Essentials of medical geology*, Selinus, O., B. Alloway, J. Centeno, R. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh and P Smedley (Eds.). Elsevier. pp 373-415.
11. C.W. Hadley, S.K. Clinton, S.J. Schwartz. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. *J Nutr.* 133, 2003, pp: 727-32.
12. W.G. Jaffé, J.F. Chávez, M.C. Mondragón. Contenido de selenio en muestras de ajonjolí (*Sesamum indicum*) procedente de varios países. *Arch Latinoam Nutr* 19, 1969 pp: 299-305.
13. D.L. Madhavi, D.K. Salunkhe. Tomato. *Food science and technology-New York* Marcel Dekker. *Handbook of vegetable science and technology.* 1998, pp. 171-201. Marcel Dekker EUA.
14. L. Magos, G.G. Berg. Selenium. in *Biological Monitoring of Toxic Metals*, T.W. Clarkson, L. Friberg, G.F. Nordberg y P.R. Soger, (eds.) Plenum Press, New York, NY, 1988, pp. 383-405.
15. H.F. Mayland. Selenium in plant and animal nutrition. in *Selenium in the Environment*, W.T. Frankenberger, Jr. y S. Benson (eds.) Marcel-Dekker, Inc. New York, NY, 1994, pp. 29-45.
16. M.C. Mondragón, W.G. Jaffé. Consumo de selenio en la ciudad de Caracas en comparación con otras ciudades del mundo. *Arch Latinoam Nutr* 26, 1976, pp: 341-352.
17. E. Murillo, O. Lombo, M. Tique, J.J. Méndez. Potencial antioxidante de la Bauhinia Kalbreyeri Harms (FABACEAE). *Información Tecnológica* 18, 2007, pp: 65-74.
18. National Research Council (US). Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board. *Recommended dietary allowances Vol. 2941*, 1980. National Academies. Washington D.C.
19. F. Nuez. El cultivo de tomate. Segunda edición Editorial Mundi Prensa. 2001., pp: 32-60.
20. P. Preciado, E. Favela, A. Benavides-Mendoza. *Manual para la Preparación de Soluciones Nutritivas.* Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México, 2006, 146pp.
21. T.S. Presser. Geologic origin and pathways of selenium from California Coast Ranges to the west-central San Joaquin Valley. in *Selenium in the Environment*, W.T., 1994.
22. P.M. Raymond. Selenium in cáncer prevention: A review of the evidence and mechanism of action. *J. Proceedings of the nutrit. Soc.* 64, 2002, pp: 527-542.
23. Z. Sahnoun, K. Jamoussie, K.M. Zegal. Free Radicals and Antioxidants: Human Physiology and Therapeutic Aspects. *Therapie* 52, 1997, pp: 251-70.
24. M. Seppanen, M. Turakainen, H. Hartikainen. Selenium effects on oxidative stress in potato. *J. Plant and Science* 165, 2003, pp: 311-319.
25. A.A. Steiner. A Universal Method for Preparing Nutrient Solutions of a Certain Desired Composition. *Plant Soil* 15, 1961, pp: 134-154.
26. N. Terry, A.M. Zayed, M.P. De Souza, A.S. Tarun. Selenium in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 51, 2000, pp: 401-432.

- 27.N.L. Vavilov. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Tanslated by K. Start. Chron. Bot 13, 1951, pp:1-366.
- 28.R.R. Villarreal. Origen y distribución de tomate. Primera edición en español. Costa Rica. 1982, pp. 66-75.

ACTIVIDAD METABÓLICA Y COMPUESTOS AROMÁTICOS EMITIDOS POR *Rhizopus stolonifer* EN JUGO DE FRESA CON DOS ESTADOS DE MADUREZ

Jazmín Salazar-Santamaria¹, Rosa Isela Ventura-Aguilar², Silvia Bautista-Baños³, Armando Magdaleno Torres-Chocolatl¹, Mónica Hernández-López³ y Ana Guadalupe Abarca-Franco⁴.

¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Complejo Regional Centro, Carretera Cañada-Morelos km. 7.5, Tecamachalco, Puebla, C.P 75492, México; ²CONACYT-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla Km. 6, San Isidro Yautepec, Morelos, C.P.62731, México; ³Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla Km. 6, San Isidro Yautepec, Morelos, C.P.62731, México; ⁴Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62209, México.

RESUMEN

Rhizopus es un microorganismo con habilidad para producir terpenos, alcoholes, aldehídos y fenoles, a partir de sustratos orgánicos. Estos metabolitos pueden ser utilizados a nivel industrial como ingredientes de perfumes, cosméticos y saborizantes. El objetivo fue evaluar la biomasa, pH, CO₂, O₂ y metabolitos volátiles emitidos por *Rhizopus stolonifer* durante 10 días, utilizando como sustrato jugo de fresa de dos estados de madurez, con la finalidad de proponer una alternativa para el aprovechamiento de los residuos agrícolas. Se realizaron ensayos *in vitro*, colocando 8 mL de jugo de fresa y 160 µL de una solución de esporas (10⁵ esporas·mL⁻¹) en viales de vidrio de 20 mL, que se incubaron a 28±1°C. La biomasa se cuantificó por gravimetría, el pH utilizando un potenciómetro y el porcentaje de CO₂ y O₂, así como los metabolitos volátiles se obtuvieron por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se utilizó la prueba de Tukey (p≤0.05) para la comparación de medias y un ANOVA para el análisis de resultados. Estos indicaron que *R. stolonifer* produjo 77 % más biomasa en jugos de fresa madura (pH= 3.28) respecto a la inmadura (pH=3.05) al tercer día. Por otra parte, el contenido de CO₂ aumento un 65%, y el O₂ disminuyó 3 veces, hacia el final de su crecimiento, independientemente de la madurez de la fresa. Los metabolitos volátiles identificados fueron el ácido pentanoico que comercialmente representa el aroma del cacao y el 1-Butanol, 3-metil-, acetato asociado con el olor a plátano. En este sentido, se recomienda el uso de fresa madura como sustrato para el crecimiento *R. stolonifer* y con potencial para su uso en la producción de compuestos aromáticos.

INTRODUCCIÓN

Rhizopus stolonifer es un hongo filamentoso, capaz de sobrevivir a temperaturas de 4 a 38°C y una humedad relativa del 70 al 80%. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como saprófito del suelo, y es capaz de invadir a los productos hortofrutícolas, que han sufrido daños físicos, llevando a cabo una rápida degradación de la pared celular de su hospedero y posterior invasión intercelular (1). Una vez que el hongo se establece en productos como el jitomate, uva, melón, maíz, plátano y fresa, entre otros, durante su crecimiento *in vitro*, forma un micelio aéreo y filamentoso de color blanco, con esporangios visibles de color negro (2).

Particularmente la fresa que actúa como uno de los hospederos de *R. stolonifer*, es una fruta no climatérica, con una reducida vida de anaquel y se deteriora hasta en un 80% después de 8 horas, por la presencia de este patógeno que es el causante de la enfermedad conocida como pudrición blanda. Según Zoffoli (3), esta enfermedad generalmente comienza en la base de las “berries” maduras y provoca el ablandamiento del tejido y pérdida del contenido de agua en la fruta, en consecuencia el fruto se pierde totalmente. La incidencia y severidad de la enfermedad causada por *R. stolonifer* en la fresa dependerá del tipo de cultivar y de su estado de madurez, ya que es capaz de infectar más rápidamente a los frutos maduros o dañados (4).

En México se producen diferentes cultivares de fresa; tales como: “Festival”, “Sweet Charlie”, “Galexia”, “Albión”, “Camarosa”, “Aromas”, “Ventana”, “Diamante” y “Camino Real” (5), los cuales poseen características específicas de sabor, color, tamaño, tienen un rendimiento diferente durante su producción y poseen una distinta resistencias a plagas y enfermedades. Específicamente el cultivar “Camino Real” en comparación con otros cultivares comerciales es de gran preferencia por los productores y consumidores, por su resistencia a diversas plagas y enfermedades como

Phytophthora, Verticillium y Antracnosis, y su rendimiento en campo es de 6.7 toneladas por hectárea. Además de ser apreciado por la calidad del fruto, como el tamaño, la firmeza, un color obscuro y un buen sabor (6).

Diversas investigaciones han evaluado el crecimiento de los microorganismos a través de su producción de CO₂, biomasa o metabolitos volátiles y no-volátiles. Estas técnicas han resultado confiables debido a que se basan en la evaluación indirecta de los cambios en el metabolismo primario y secundario de los hongos filamentosos. El metabolismo primario es el resultado de varias reacciones químicas catalizadas por las enzimas del microorganismo y proporciona a las células energía y las macromoléculas indispensables para su crecimiento. Se produce por lo general durante el crecimiento exponencial del micelio, obteniendo un gran número de moléculas de interés industrial, tales como el ácido cítrico, diferentes ácidos orgánicos, alcoholes y también enzimas como celulasas, amilasas o pectinasas. El metabolismo secundario se produce cuando el crecimiento de los hongos filamentosos se detiene y uno de los intermediarios más importantes es el Acetil-CoA que favorece la formación de: a) terpenos como los carotenoides, ergosterol y ácido giberélico, b) derivados de ácidos grasos entre ellos poliacetileno, c) derivados de aminoácidos como alcaloides, penicilina, cefalosporina y d) policétidos (7).

Los compuestos aromáticos o volátiles producidos durante el metabolismo de diversos hongos resultan de interés para diferentes industrias, reportándose una producción de 250 compuesto aromáticos, los cuales se producen como mezclas de hidrocarburos simples, aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles, ésteres y sus derivados, incluyendo, los derivados del benceno y ciclohexanos. La síntesis de estos compuestos aromáticos está relacionada principalmente con las propiedades ligninolíticas del hongo (8). Particularmente las cepas de *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus oligosporus* son objeto de investigación en procesos de fermentación a escala industrial, por medio de los cuales se obtienen productos típicos como el sake (bebida alcohólica asiática) y el tempe (alimento a base de soja parecido a la carne) (9). Además a partir del crecimiento de este género se obtienen saborizantes artificiales como el citronelilo y enzimas como las amilasas que son producidas por *Rhizopus microsporus* (10). No obstante *R. stolonifer* aún no ha sido aprovechado industrialmente y este podría resultar de interés para la obtención de aromas con aplicaciones en el sector de alimentos como el acetato de etilo, y otros compuestos que en la actualidad se producen a través de síntesis química o extractos de plantas (11). Por lo que resulta una importante alternativa la obtención de sustancias aromáticas durante el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus stolonifer*, como una alternativa para el aprovechamiento de los residuos agrícolas, considerando la biomasa, pH, CO₂, O₂ y metabolitos volátiles como parámetros de crecimiento.

PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento, mantenimiento e identificación de R.stolonifer

Rhizopus stolonifer se aisló de frutos de fresa infectados por medio de la técnica de cámara húmeda y se sembró en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), posteriormente el desarrollo del micelio y partes reproductivas, se observaron en un microscopio modelo eclipse E100 (Nikon, China), para su identificación. Una vez obtenida la cepa pura se mantuvo en incubación (Binder, USA) durante 4 días a 28°C.

Obtención de la solución de esporas de R.stolonifer

20 mL de agua estéril se colocaron en una caja Petri que contenía la cepa de *R. stolonifer* y con una ajuga de disección se raspo la superficie, con la finalidad de desprender las esporas presentes en el micelio, mismas que se recuperaron en un matraz Erlenmeyer. Posteriormente 15 µL de la solución se colocaron en cámara Neubauer (Bright- Line Hemacytometer 0.1mm, Hausser Scientific, USA) y se observaron en un microscopio óptico (Nikon, China). La concentración de esporas por mL, se ajustó a una concentración final de 10⁵. Posteriormente 160 µL de esporas se inyectaron a cada uno de los viales que contenían el jugo de fresa, previamente pasteurizado y se incubaron a 28 ± 2 °C en un agitador orbital durante 10 días.

Manejo del experimento

Se adquirieron en huertos comerciales de Xochitepec, Morelos, México, fresas (*Fragaria ananassa* Dutch), con dos diferentes estados de madurez, de acuerdo a la NMX-FF-062-1987. Fruta Fresca. Fresa (*Fragaria vesca*). El estado maduro incluyó fresa con el 100 % de la coloración roja en su superficie y el estado inmaduro se conformó por fresa con un 50% de color rojo en su superficie. Las

fresas se lavaron y desinfectaron con una solución clorada al 1% durante 5 min. Después se obtuvo el jugo de la fruta con un extractor modelo ETW-9800, se filtró y se pasteurizó (75°C x 2 min). 8 mL del jugo se colocaron en viales de vidrio de 20 mL (previamente esterilizados), se cerraron herméticamente y posteriormente se inyectaron 160 µL de la solución de esporas 10⁵. Finalmente los viales se incubaron a 28 ± 2 °C en un agitador orbital (Innova 40, U.S.A). Se formaron dos lotes con 24 viales y se aplicaron los siguientes tratamientos: T1) Jugo de fresa madura inoculada con *R. stolonifer*, T2) Jugo de fresa madura no inoculada, T3) Jugo de fresa inmadura inoculada con *R. stolonifer* y T4) Jugo de fresa inmadura no inoculada. Cada vial fue una unidad experimental y se evaluaron tres repeticiones por tratamiento. Los días de crecimiento en los que se analizó el comportamiento del hongo fueron: 5 y 10.

Evaluación del crecimiento de R. stolonifer

Cuantificación de biomasa seca

La biomasa fúngica se recuperó del jugo de fresa inoculado con *R. stolonifer*, por filtración a través de un papel Whatman No.1, después la muestra se secó en un horno a 60°C (Brincker, Germany), hasta obtener un peso constante y se reportó como gramos de peso seco.

pH

Se determinó durante los días de evaluación, en los jugos de fresa inoculados con *R. stolonifer* y en el grupo control. Se utilizó un potenciómetro (Termo scientific, USA), para realizar la evaluación.

Contenido de CO₂ y O₂

Se recuperó 1 mL del aire contenido en el espacio de cabeza del vial de cada uno de los tratamientos y se inyectó en un cromatógrafo de gases 7800 B (Agilent, USA), equipado con 2 detectores, uno de conductividad térmica (TCD) y otro de ionización a la flama (FID) (Grace Vydac Co., Columbia, MD, EE.UU.). Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 10 mL·min⁻¹, la temperatura del horno se mantuvo a 40 °C y el inyector a 210 °C. Las temperaturas de los detectores de conductividad térmica y de ionización de flama fueron de 200 °C y 250 °C, respectivamente. Los tiempos de retención para el CO₂ fueron 2.6 minutos y 6.5 minutos para el O₂.

Perfil volátil de R. stolonifer

Las muestras se analizaron mediante la técnica de espacio de cabeza utilizando un cromatógrafo de gases SCION 456-GC (Bruker Daltonics, Billerica, EE.UU.) acoplado a un detector de masas EVOQ triple cuádrupolo (TQ) y un PAL-COMBI xt (Bruker Daltonics, Inc.). Este sistema fue operado por el software MS Workstation versión 8.2 (Bruker Daltonics, Inc.). El detector de MS fue operado en el modo de exploración que oscilaba entre 50 y 500 masa/carga. El horno de GC fue equipado con una columna capilar BR-1ms de espesor de película de 0.25 mm (Bruker Daltonics, Inc.) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno. El inyector estuvo en modo Split y se mantuvo a 250°C y el detector a 230°C. El horno se mantuvo a 40°C durante 20 min, luego se calentó a 8°C·min⁻¹ hasta alcanzar los 250 °C y se sostuvo durante 10 min a esta temperatura. Las muestras se incubaron a 60 °C durante 20 min y posteriormente se recuperó 1 mL del gas contenido en el de espacio de cabeza del vial. La identificación de los compuestos se realizó a partir de la comparación de los espectros de masas contenidos en la biblioteca NIST.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron a través de un ANOVA con arreglo factorial y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Se utilizó el software InfoStat,(2017)

RESULTADOS

Aislamiento, mantenimiento e identificación de R.stolonifer

El aislamiento de *R. stolonifer* en fresa infectada se realizó al observarse la sintomatología característica del fitopatógeno. En la Figura 1A se muestra la fresa infectada, la cual presenta un crecimiento fúngico, se observó la liberación de un exudado de color rojo y la superficie de la fresa se cubre por filamentos blancos y puntos negros característicos del hongo. Es importante mencionar que el crecimiento de *R.stolonifer* se presentó en condiciones de alta humedad relativa 70-75% y una temperatura de 25±3 °C (cámara húmeda). Por otra en la Figura 1B-C se presenta el aislamiento en medio PDA de *R.stolonifer* en el cuarto día de su crecimiento. El comportamiento observado coincide con los reportes de Bonifaz (12) quien indicó que el micelio de *R. stolonifer* alcanza un tamaño ilimitado y puede llegar a cubrir todo el medio de cultivo, sus esporas son colonias blancas y alcanzan su madurez al cuarto día y posteriormente adquieren una tonalidad gris oscura (la

tonalidad se debe al desarrollo de las estructuras de reproducción asexual), las endosporas son algodonosas y secas. En el presente estudio *Rhizopus stolonifer* se identificó y clasificó observando al microscopio sus estructuras características del género y posteriormente se comparó con los reportes de Shipper (13). Los resultados mostraron la presencia de esporangióforos y esporangiosporas, además del desarrollo de uno a tres esporangióforos sin ramificación a partir del rizoide (Figura 1D).

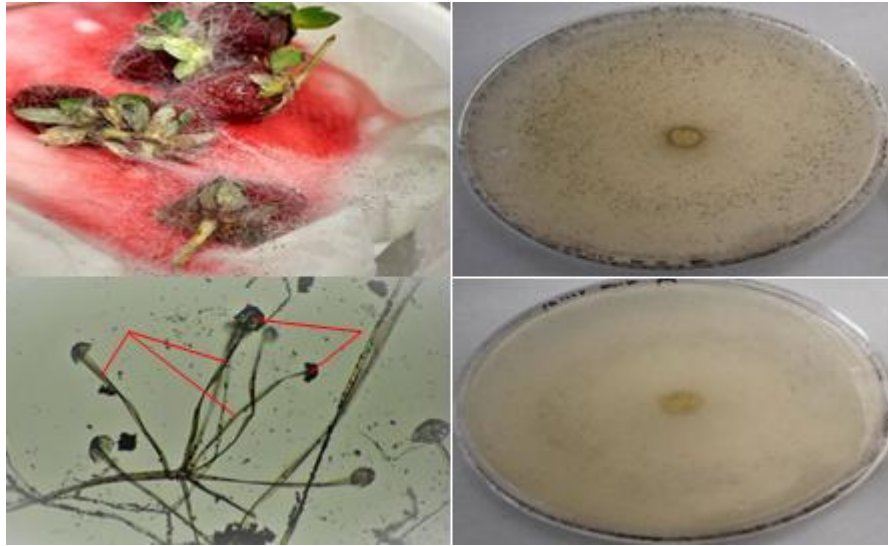


Figura 1.- Aislamiento en “Cámara Húmeda” de *R. Stolonifer* en frutos de fresa a 20 – 25 °C **(A)**, Desarrollo micelial *R. Stolonifer* en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) **(B)** vista frontal y **(C)** vista lateral del hongo incubado a 28°C por 4 días y **(D)** micelio observado en microscopio **(a)** Esporangióforo con esporangio y **(b)** esporangiosporas de *R. stolonifer*, observado en microscopio 10X.

Viabilidad de R. stolonifer a partir de su crecimiento micelial y concentración de esporas

En la Figura 2, se presenta el crecimiento micelial y la concentración de esporas de *Rhizopus stolonifer* a través del tiempo ($p \leq 0.05$). La Figura 2A, se muestra el máximo crecimiento del hongo en medio PDA al tercer día y aumentando 3 veces su diámetro con respecto al día inicial. Del mismo modo la concentración de esporas tuvo un aumento del 80% a partir de su máximo desarrollo micelial (Figura 2B).

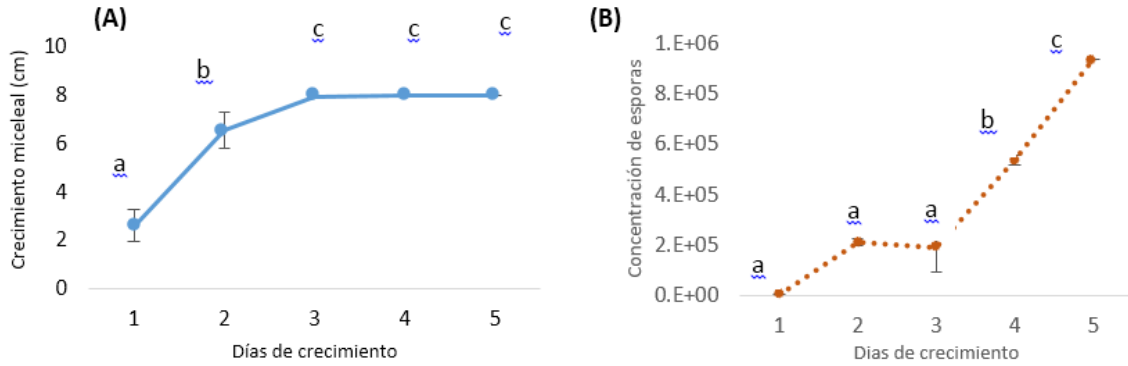


Figura 2.- Cinética de crecimiento (A) y concentración de esporas (B) de *Rizopus stolonifer* en medio PDA a 28°C.

Contenido de biomasa de *R. stolonifer* en el jugo de fresa

La biomasa es un parámetro que puede ser utilizado como indicador de la velocidad de crecimiento de un microorganismo. Los resultados mostraron que la biomasa se modificó con el transcurso del tiempo, independientemente del estado de madurez del sustrato (Figura 3). En jugos de fresa madura la biomasa de *R. stolonifer* aumentó en un 77% al tercer día, mientras que en jugos de fresa inmadura el aumento fue de 74 % hasta el quinto día, es decir, se retardo el crecimiento de *R. stolonifer* por estado de madurez. Los resultados obtenidos pueden ser explicados a través de los reportes de Amiri (14) quien indico que la producción de biomasa de *R. stolonifer* fue mayor cuando la sacarosa y fructosa se utilizaron como fuentes de carbono para su crecimiento y este tipo de azúcares se encuentran en fresas maduras.

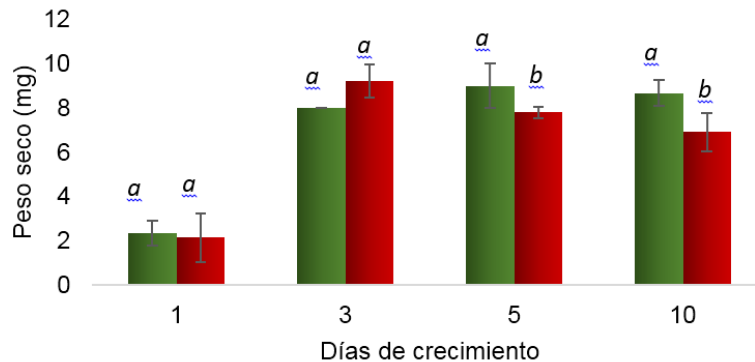


Figura 3.- Contenido de biomasa (mg de peso seco) de *Rhizopus stolonifer* en jugos de fresa inmadura (■) y madura (■).

Cambios en el pH del sustrato por efecto de la presencia de *R. stolonifer*

El pH es una variable que puede determinar desde el punto de vista biológico al tipo de organismo que se desarrolle en un medio, debido a su influencia sobre la disponibilidad de nutrientes. Los resultados mostraron que el pH está determinado por el estado de madurez independientemente del tiempo de almacenamiento ($p \leq 0.05$) como se presenta en el Cuadro 2. Los resultados obtenidos pueden ser explicados por los estudios realizados por Amiri (2011) en donde el crecimiento micelial óptimo de *R. stolonifer* ocurre a un pH 3 y su crecimiento se inhibe totalmente a un pH de 2.5.

Cuadro 2.- pH de jugo de fresa inoculado con *R. stolonifer* durante 10 días, incubado a 28°C

	Días de crecimiento			
	1	3	5	10
Jugo de fresa madura	3.56 ± 0.001 ^a	3.28 ± 0.058 _a	3.40 ± 0.039 _a	3.34 ± 0.021 _a
Jugo de fresa inmadura	3.05 ± 0.005 ^b	3.07 ± 0.002 _b	3.07 ± 0.011 _b	3.05 ± 0.029 _b

*Letras iguales en columna muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)

Contenido de CO₂ y O₂ en jugos de fruta durante el crecimiento de *R. stolonifer*

El contenido de CO₂ y O₂ en los jugos no presentó cambios significativos ($p \leq 0.05$) por efecto del estado de madurez, pero sí a través del tiempo. En el quinto día de crecimiento se alcanzó la máxima producción de CO₂, siendo los jugos de fresa madura los que alcanzaron los mayores niveles respecto al estado inmaduro (65% y 46%, respectivamente). En la Figura 4A, se observa que al aumentar el contenido de CO₂, disminuyó considerablemente el nivel de O₂ (81%) durante los 3 primeros días, que coincide con el máximo crecimiento del hongo (Figura 4B).

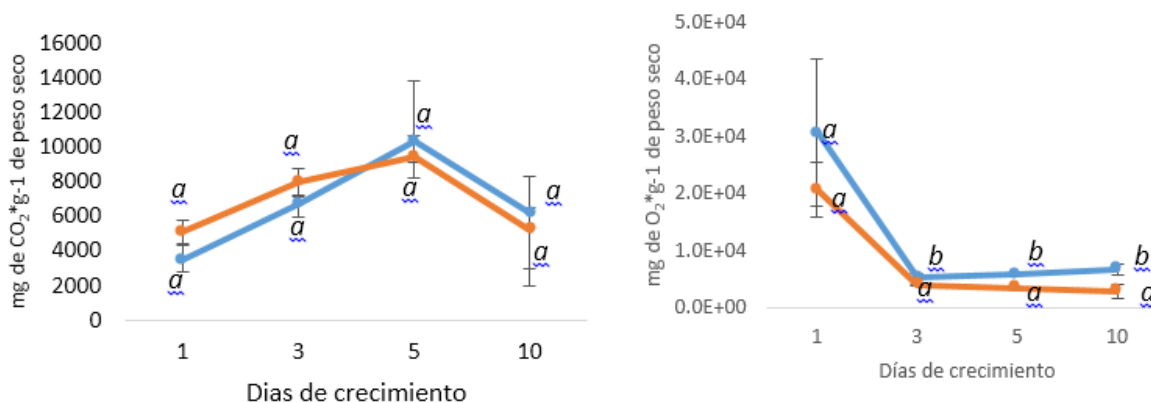


Figura 4.- (A) Contenido de CO₂ (mg de CO₂ g⁻¹ de peso seco) y (B) Contenido de O₂ (mg de O₂ g⁻¹ de peso seco) en jugos de fresa inmadura () y madura ().

Efecto del estado de madurez de la fresa en el contenido compuestos volátiles

El aroma es una propiedad organoléptica que se compone por diferentes sustancias volátiles presentes en los alimentos y que pueden modificarse con facilidad con el manejo del producto (15). Durante la presente investigación se analizaron los compuestos aromáticos emitidos por *R. stolonifer* crecido en jugo de fresa madura, por ser este el sustrato que favorece el crecimiento del microorganismo. Se cuantificaron 4 compuestos aromáticos más al final del crecimiento del hongo y 4 veces más contenido de aromas después de 10 días de crecimiento del microorganismo.

Los compuestos aromáticos que predominaron fueron el ácido pentanoico que comercialmente representa el aroma del cacao y el 1-Butanol, 3-metil-, acetato que se asocia con el aroma del plátano. Ambos compuestos se utilizan como disolventes para la preparación de perfumes y esencias artificiales de frutas (15).

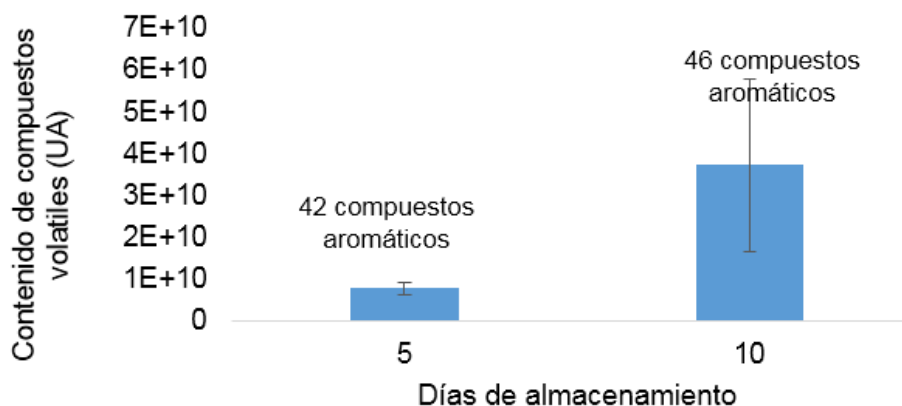


Figura 5.- Número y contenido de compuestos volátiles emitidos por *R. stolonifer* crecido en jugo de fresa madura durante 10 días.

CONCLUSIONES

Se recomienda el uso de fresa madura como sustrato que favorece el crecimiento *R. stolonifer* y con potencial para su uso en la producción de compuestos aromáticos. Además la biomasa y el contenido de CO₂ permitieron explicar el crecimiento del hongo en el jugo de fresa.

REFERENCIAS

1. L.I. Chávez- Díaz, "Biocontrol de *Rhizopus stolonifer* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus*) empleando microbiota nativa, asociada a la planta". Tesis de maestría (2011), Instituto Politécnico Nacional, México. pp. 18- 19.
2. A. Solorio-Enríquez. "Identificación de hongos fitopatógenos de frutos de fresa (*Fragaria* sp.) en postcosecha del centro de abastos de Zamora, Michoacán e Irapuato, Guanajuato". Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México (2000). pp. 17-19.
3. J.P. Zoffoli y B.A. Latorre. "Table grape (*Vitis vinifera* L.)" in *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Cocona to Mango* (Woodhead Publishing, USA. 2011), Chapter 9, pp. 179-212.
4. J.E. Harris, C. Dennis. "Distribution of *Mucor piriformis*, Elhadi Yahia (eds). *Rhizopus sexualis* and *Rhizopus stolonifer* in relation to their spoilage of strawberries". *Critical Reviews Transactions of the British Mycological Society*. Vol. 75, 1980, pp.445-450.
5. N.A. Rocha de la Cruz. "Crecimiento y desarrollo de tres variedades de fresa en tres tipos de sustratos". Tesis de maestría. Centro de Investigación en Química Aplicada, México (2014), pp. 9-10.
6. E.A. Sánchez, "Variedades de fresa con potencial de producción en el Estado de México". 2013. http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/15/2013/anuales/anu_555-6-2014-05-4.pdf (consulta, abril 2018).
7. J.P Blanc., M.O. Loret, G. Goma. "Advances in solid state fermentation" in *Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation*. Montpellier, France. in press (1995). Charper 5, pp 355-378.
8. A. Korpi., J. Järnberg y L. A. Pasanen,"Microbial volatile organic compounds". *Critical Reviews in Toxicology*, Vol 39, 2, 1990, pp. 139-193.
9. M. Egounlety, O.C. Aworh. "Effect of ssoaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.) cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and ground bean (*Macrotyloma geocarpa* Harms), *Journal of Food Engeenering*, Vol. 56, 2003, pp. 249-254.

10. S.C Piexoto., J.A. Jorge, H.F. Terenzi., M.L.T.M. Polizeli. "*Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis*: a thermos tolerant fungus with potential for production of thermostable amylases". *International Microbiology*, 2003, pp. 260- 273 pp.
11. G. Reyes-González; M. Franco-Correa. "Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras", *Universitas Scientiarum*, Vol. 1, 2006, pp. 23-30.
12. Bonifaz, A. "Micología Médica Básica". McGrawHill: México (2012). 4 edición, Capítulo 5: Hongos Contaminantes, pag 63, 600p.
13. M.A.A. Schipper."A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rh. stolonifer*-group and *Rh. Oryzae*". *Studies in Mycology*. 25:1-19 (1984)
14. A. Amiri, W. Chai, G. Schnabel, "Effect of nutrient status, pH, temperature and water potential on germination and growth of *Rhizopus stolonifer* and *Gilbertella persicaria*". *Journal of Plant Pathology*, 2011, pp. 603-612.
15. E.L. Arias-Cifuentes y P.A.Piñeros- Espinosa. "Aislamiento e identificación de muestras de suelode los parmos de Guasca y Cruz verde". Trabajo de Grado. Ponificadora Universidad Javeriana, Bogota, D.C. (2008)

EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILAS A Y B, RESPECTO AL ÍNDICE DE MADUREZ DE *PSIDIUM GUAJAVA L.*

María de Jesús Juárez Ayala¹, Consuelo de Jesús Cortés Penagos¹, Berenice Ya huaca Juárez¹, Liliana Avilés Álvarez¹, Raúl Cortés-Martínez¹, José Saul Padilla Ramírez²

¹Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tzintzuntzan 173, Col. Matamoros, 58240 Morelia, Michoacán. México. ²Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Pabellón, Km 32.5 carretera Aguascalientes – Zacatecas, C.P. 20660, Pabellón de Arteaga, Ags. México. Correo-E: marryjua_5@hotmail.com

RESUMEN

El estado de madurez fisiológica que poseen el fruto de guayaba (*psidium guajava L.*), al ser cosechada, es afectada por el manejo Pos Cosecha: a) Transporte, b) Almacenamiento, y c) Comercialización. El color es el principal atributo de calidad, en la epidermis del fruto, que presenta influencia en la preferencia del consumidor, induce la expectativa de sabor, gusto y palatabilidad. Está determinado por la concentración pigmentos contenidos en los cloroplastos y cromoplastos, importantes para la industria alimenticia y farmacéutica, utilizados como colorantes en los alimentos y por su acción biológica relacionada con la respuesta inmune y antimutagénica. La clorofila a otorga el color verde-azul (verde Intenso) y la clorofila b confiere el amarillo verde (verde). La evaluación del fruto de guayaba (*psidium guajava L.*), se realizó en tres estados de madurez fisiológica, los resultados del análisis estadístico de Tukey HSD ($P > 0.005$) aplicado a las variables; I) Guayaba Verde: Tonalidad verde, firmeza [88.35 ± 0.001^A N], Índice de Madurez [12.12 ± 0.004^C], Clorofila a [2.916 ± 0.021^B mg/L], Clorofila b [1.472 ± 0.012^A mg/L], II) Guayaba Rayada: Tonalidad verde - amarillo, firmeza [65.38 ± 0.002^B N], Índice de Madurez [16.34 ± 0.002^B], Clorofila a [0.814 ± 0.003^A mg/L], Clorofila b [0.336 ± 0.001^B mg/L], III) Guayaba Amarilla: Tonalidad Amarillo, firmeza [20.32 ± 0.002^C N], Índice de Madurez [25.45 ± 0.019^A], en base a los resultados obtenidos la clorofila a y b, se presentan en la epidermis del fruto de guayaba (*psidium guajava L.*), en las primeras dos etapas de madurez fisiológica, la relación concentración de clorofilas (a y b), y firmeza son inversamente proporcional al índice de madurez.

Palabras clave: Clorofila, Índice de Madurez y Firmeza.

INTRODUCCIÓN

El color que presentan los frutos es el principal atributo para su comercialización, debido que influye de manera visual en la aceptación o rechazo del consumidor sin una evaluación previa a sus características sensoriales y valor nutricional, por lo cual, es de gran importancia para la industria alimentaria realizar análisis de color mediante el uso de colorímetros y evaluación sensorial (panel de degustación) en los alimentos. Se atribuye a la presencia de pigmentos: antocianinas y clorofilas, los cuales, les confieren las tonalidades amarillas, verdes, anaranjadas, rojizas y violetas características, además de que la presencia en su composición cuantitativa y cualitativa, se relaciona directamente con el estado de madurez, mostrado un contenido diferencial durante el proceso de maduración. Por su diversidad estructural y numerosas funciones, están involucrados en el proceso de la fotosíntesis; previenen la salud de los seres humanos, por su significativa actividad antioxidante.

TEORÍA

En las plantas las clorofilas son los pigmentos responsables de otorgarles el color verde, localizadas junto a los carotenoides en los plastidios, son moléculas foto receptoras que se encargan de transformar la energía lumínica en energía química.

Estudios realizados en frutos demuestran que la concentración de pigmentos clorofílicos disminuyen en el proceso de maduración, generando la formación de pigmentos como los carotenoides, proceso llamado caroteno génesis, en el cual, de forma ejemplar se presenta un pimentón, en el que se exhibe un incremento en tonalidad roja y decremento en la tonalidad verde, por la biosíntesis que se está llevando a cabo en los pigmentos localizados en los cromoplastos, como zeaxantina, β -criptoxantina o violaxantina, y una disminución de los pigmentos presentes en los cloroplastos,

como la luteína y neoxantina. Estos últimos pigmentos, específicamente la Luteína, están ligados directamente con el proceso de la fotosíntesis. Cabe mencionar que existen Frutas que no presentan caroteno génesis, debido, a que en el transcurso del proceso de maduración se mantiene la concentración de clorofilas y se degradan los carotenoides, como ocurre en la pulpa del aguacate, donde el contenido total de estos pigmentos decrece de manera exponencial.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Pulpa Fresca de Fruto de Guayaba (*psidium guajava L.*), en tres estados de madurez: 1. Guayaba Verde (Estado I), 2. Guayaba Rayada (Estado II), 3. Guayaba Amarilla (Estado III).

1. Color del Fruto de Guayaba (*psidium guajava L.*)

Para medir objetivamente el color en los alimentos que son translúcidos se utiliza el método tri estímulo Hunter L,a,b. Este método se basa en la determinación, por reflexión de la luz, de tres parámetros. El parámetro "L", que mide el grado de luminosidad y varía desde 100 para el blanco perfecto a 0 para el negro; los parámetros "a" y "b", son indicativos de la cromaticidad, los valores positivos de "a", están relacionados con el color rojo y los negativos con el color verde; mientras que los valores positivos del parámetro "b", están asociados con el color amarillo y los negativos con el azul.

Para la medición del fruto de guayaba se utilizó un colorímetro Mca. Hunter Lab MiniScan, procediéndose de la siguiente forma: el colorímetro se calibró con una placa blanca de porcelana. Los frutos de Guayaba (*psidium guajava L.*), se colocaron en un contenedor de cuarzo, para su medición en el equipo. Las lecturas se realizaron por serie n=10 con respecto a cuatro posiciones localizadas 90° una respecto a la otra. Se midieron los valores de L , a , y b . Para determinar el tono, el cual es calculado por Hue° (ecuación 1) y la saturación del color, calculado a través de Chroma (Ecuación 2). El cual nos muestra la separación de los tonos grises y se acerca a un color puro del espectro.

Ecuación 1

$$\text{Hue}^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b}{a} \right) \text{ Si } a > 0 \text{ y } b = 0$$

Ecuación 2

$$C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

2. Firmeza

Se determino en n = 30 por triplicado, en la epidermis del fruto fresco de Guayaba (*psidium guajava L.*), para los tres Estados de Maduración (I,II,III), a través del Texturometro XT21, los resultados se reportaron en Newton (N).

3. Análisis Cualitativo y Cuantitativo de Clorofilas

Se adicionan 30 ml de solución de acetona-agua (90%) a 12 g de pulpa fresca de guayaba (Estados de madurez: I,II y III), se agita en vortex 5 minutos, para dejar reposar 24 hrs, durante este periodo es recomendable agitarlo 3 o 2 veces, después de 24 hrs volver agitar y posteriormente pasar la solución en tres tubos Falcón, Centrifugar durante 10 minutos. Leer 665, 645 y 630 nm, se utiliza como blanco (acetona –agua 90%), el análisis se llevo a cabo en ausencia de luz.

Ecuación 3.

$$Ca \text{ (mgAl}^{-1}\text{)} = (11,6 \text{ (D.O.665)}) - (1,31 \text{ (D.O.645)}) - ((0,14 \text{ D.O.630}))$$

$$Cb \text{ (mgAl}^{-1}\text{)} = (20,7 \text{ (D.O.645)}) - (4,34 \text{ (D.O.665)}) - (4,42 \text{ (D.O.630)})$$

Donde:

Ca, Cb y = concentraciones de clorofila "a" y "b" respectivamente.

D.O. = Densidad Óptica Medida.

RESULTADOS

En base a los resultados del análisis estadístico de Tukey HSD ($P > 0.005$) aplicado a las variables: tonalidad, firmeza_(N) e Índice de Madurez (Tabla 1.), presentan diferencia significativa en los tres estados de madurez fisiológica del fruto de guayaba (*psidium guajava L.*), además de una relación inversamente proporcional de la firmeza con respecto al Índice de Madurez.

Tabla 1. Análisis de Color, Firmeza_(N), Índice de Madurez en *psidium guajava L.*
± Desviación Estándar Literales Iguales en la Columna Indica que no hay Diferencia Estadística ($P < 0.05$).

Estado De Madurez	Tonalidad	Firmeza (N)	Índice De Madurez
I	Verde	88.35 ± 0.001 ^A N	12.12 ± 0.004 ^C
II	Verde/Amarillo	65.38 ± 0.002 ^B N	16.34 ± 0.002 ^B
III	Amarillo	20.32 ± 0.002 ^C N	25.45 ± 0.019 ^A

La Tabla 2. Indica que la clorofila “a” y “b” únicamente están presentes únicamente en las dos primeras etapas de madurez fisiológica (I y II) del fruto de guayaba (*psidium guajava L.*) y su concentración va disminuyendo en durante el proceso de maduración, presentando una variación significativa, debido que la clorofila “a” otorga el color verde-azul (verde Intenso) y la clorofila “b” confiere el amarillo verde (verde), al fruto de guayaba.

Tabla 2. Análisis Cualitativo y Cuantitativo de Clorofila “a” y “b” en *psidium guajava L.*
± Desviación Estándar Literales Iguales en la Columna Indica que no hay Diferencia Estadística ($P < 0.05$).

Estado De Madurez	Clorofila (mg/L)	
	a	b
I	2.916 ± 0.021 ^B	1.472 ± 0.012 ^A
II	0.814 ± 0.003 ^A	0.336 ± 0.001 ^B

CONCLUSIONES

El Índice de Madurez es un parámetro que no permite evaluar el estado de madurez fisiológica que poseen el fruto de guayaba (*psidium guajava L.*), esta relacionado inversamente proporcional con la firmeza (Tabla 1.), para determinar la calidad del fruto, así como el color que posee la epidermis del fruto, la clorofila “a” otorga el color verde-azul (verde Intenso) y la clorofila “b” confiere el amarillo verde (verde), únicamente se presentan en las dos primeras etapas de madurez fisiológica (Tabla 2), y se van degradando en el trascurso del proceso de Maduración Fisiológica e influyen en la preferencia del consumidor, induciendo a la expectativa de sabor, gusto y palatabilidad, además de su acción biológica relacionada con la respuesta inmune y antimutagénica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Camacho, e. K. (2013). Revista EIA, ISSN 1794-1237 / Publicación semestral / Volumen 10 / Número 19 / Enero-Junio 2013 /pp. 79-89 Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia) Historia Artículo recibido 29-III-2012 Aprobado 27-VIII-2012 Discusión abierta hasta 01-. EIA , 78-89.
2. Fernanda Zaccari¹, 2. M. (2017). Parámetros colorimétricos y contenido de pigmentos en cinco colores de. *Agrociencia Uruguay*, 23-30.

-
3. R.L. Dantas, S. S. (2015). CHANGES DURING MATURATION IN THE BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OPUNTIA STRICTA (HAW.) FRUITS. *International Society for Horticultural Science*, 159-165.
 4. Teresa Monroy-Gutiérrez, M. T.-D.-P.-V.-A.-M. (2017). BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN FRUITS OF XOCOTUNA, CACTUS PEAR AND XOCONOSTLE (Opuntia spp.). *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 263-272.

EVALUACIÓN DE 14 CARACTERÍSTICAS DE MEZQUITE *PROSOPIS LAEVIGATA* DE CINCO LOCALIDADES DEL ESTADO DE GUANAJUATO.

Martha Patricia Sandoval Anguiano¹, Martha Castillo Anguiano², Jaquelina Gonzalez Catañeda³

¹Universidad de Guanajuato-ENMSI, ²Universidad de Guanajuato-ENMSI, ³Universidad de Guanajuato-DICIVA

RESUMEN

El mezquite tiene una gran variedad de usos, la especie *Prosopis laevigata* es la más común en el estado de Guanajuato, se le utiliza como madera, (incluso se elaboran hormas para zapatos en el Municipio de León) forraje, alimento como la harina y miel, por lo cual es necesario caracterizarlo morfológicamente para aprovecharlo, conservarlo, mejorarlo y generar su sustentabilidad.

En este trabajo se evaluaron 25 accesiones de la especie *Prosopis laevigata*, utilizando el método de los componentes principales, por medio del cual se formaron tres grupos diferentes con las 14 características morfológicas que se estudiaron, que explican el 69.801% de la varianza total. El primer componente incluye las características: Perímetro del tronco, Dosel y número de foliolos por pina en cambio, la longitud de vainas, el número de vainas en 1/20 de dosel, semillas por vaina y número de hojas en 20 cm. ayudaron a la formación del segundo componente. El número de pinas así como el número de hojas en 20 cm y número de ramas principales forman el tercer componente. El cuarto componente está formado básicamente por los pares de pinas en 20 cm y el número de ramas principales.

Se realizó un análisis jerárquico por medio del cual se generó un dendrograma que traza la cercanía genética entre las accesiones y muestra la variabilidad de las diferentes accesiones dentro de la especie.

Hay tres distancias genéticas en las que se pueden separar las accesiones de mezquite. El primer grupo formado por 12 accesiones de las cinco localidades, ubicadas a 10 unidades de distancia genética; un segundo conjunto con 9 accesiones procedentes de Yuriria, Silao, Apaseo, Romita y Pénjamo y casi 18 unidades; un tercero formado por otras 4 accesiones provenientes de Yuriria, Silao y Apaseo a 24 unidades de distancia genética.

El análisis de conglomerado jerárquico se llevó a cabo por el Método de vinculación inter-grupos de las variables estudiadas y se generó la gráfica de componentes rotados. La altura de fuste en cm una variable que correlaciona negativamente con diez variables en estudio y que puede ser un factor importante a considerar dentro del mejoramiento genético de especies del género *Prosopis*.

Palabras clave: Perímetro, tronco, altura, distancia genética, dosel, foliolos

INTRODUCCIÓN

Según Rzedowsky (1981), las especies del género *Prosopis* presentan dificultades para su clasificación taxonómica causada por la enorme variabilidad entre plantas individuales y entre individuos dentro de una especie bien delineada y los híbridos generados entre diferentes especies. El factor medio ambiental y su interacción con el genotipo tiene efectos en la morfología de gran parte de las especies de *Prosopis* que varían con el medio ambiente donde se ubican, en consecuencia hace que se presente una gran variación genotípica y fenotípica, por lo que la labor de los centros de investigación con poblaciones nativas, se torna muy problemática y por lo mismo, se requiere de una caracterización morfológica sistemática de cada una de las accesiones que componen el acervo de una colección viva como la que se mantiene en el Estado de Guanajuato y generar la sustentabilidad del género.

El objetivo del trabajo fue el estudiar la variabilidad y las relaciones filogenéticas entre 25 accesiones de la especie de *Prosopis laevigata* Rzedowski (1981).

PARTE EXPERIMENTAL

Accesiones en estudio

Se evaluaron 25 accesiones de *Prosopis laevigata*, originarias de cinco localidades diferentes del Estado de Guanajuato que son: Pénjamo, Romita, Apaseo el Alto, Silao y Yuriria. Las accesiones fueron caracterizadas morfológicamente y evaluadas por el programa Statistical Program of Social Science (SPSS 18.0). Se evaluaron 14 caracteres para cada accesión: Perímetro del tronco, altura

del fuste, número de ramas principales, altura del árbol, dosel, pares de espinas en 20 cm., longitud media de espina, número de hojas en 20 cm, número de pinas, número de folíolos por pina, longitud de vainas, grosor de vainas, semillas por vaina y número de vainas en 1/20 de dosel.

Organización de datos

La matriz básica de datos (MBD) se construyó a partir de la información obtenida del muestreo de plantas de cada accesión localizada dentro de las colecciones de Mezquites.

Análisis de datos

-Medidas para el análisis de caracterización

Se llevó a cabo la caracterización morfológica del material por el método de los componentes principales para identificar las variables que más contribuyen a la varianza entre las plantas evaluadas y el análisis de los conglomerados jerárquicos. Se estudió el arreglo entre las 25 accesiones y las 14 variables para establecer el índice de distancia, por medio de la distancia Euclidiana; así como el coeficiente de correlación.

Las medidas descriptivas fueron calculadas para las cinco localidades. Los datos de las características morfológicas fueron estandarizados con el programa SPSS 18 y se utilizaron para construir la matriz de datos y obtener el dendrograma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de las accesiones fueron analizados con los estadísticos descriptivos de promedio y desviación estándar de cada variable. En la tabla 1 se reportan los resultados.

Para el caso de las accesiones de Apaseo el Alto la mayor desviación la presentan las variables: número de ramas principales, dosel, pares de espinas en 20 cm., longitud media de espinas, no. de folíolos por pina y grosor de vainas, lo que indica ser el grupo más diverso; en cambio las accesiones provenientes de Yuriria lo hacen en las variables perímetro del tronco y altura de fuste. El número de folíolos por pina, longitud de vainas y número de vainas en 1/20 de dosel poseen la mayor desviación en el caso de los individuos de Romita. Las plantas originarias de Silao la tienen las variables número de hojas en 20 cm. semiterminales, número de pinas y en semillas por vaina, por lo que las accesiones provenientes de Pénjamo son las más parecidas.

	Pénjamo	Romita	Apaseo El Alto	Silao	Yuriria	Pénjamo	Romita	Apaseo El Alto	Silao	Yuriria
1	48.8	116.2	90.8	167	164.8	24.26	34.831	55.6165	36.667	76.45
2	87	64.4	155.2	27.2	99	19.72	42.081	89.5835	9.0388	103.1
3	2	2.4	2.8	2.8	2.4	0	0.5477	1.30384	0.8367	0.548
4	5.6	8.2	7.4	12	10.2	3.286	1.9235	3.91152	3.3912	3.701
5	820	760	680	1120	1280	334.7	207.36	356.371	238.75	342.1
6	5.8	6.4	8.8	5.8	5.6	0.447	0.8944	5.01996	1.3038	1.517
7	10.4	14.2	9.8	11	9.6	3.578	1.6432	4.76445	2.9155	0.894
8	36.4	23.2	30.4	46.4	51.4	14.29	12.518	8.38451	25.126	22.74
9	2.4	2	2	2.8	2.8	0.894	0	0	1.0954	1.095
10	50.4	57.2	31.4	61.2	65.2	4.336	15.401	14.7919	11.278	11.28
11	15.8	16.2	15.8	18.2	18.2	2.168	3.4205	1.48324	3.1937	2.864
12	12.6	11	11.6	11	10.4	0.894	1.2247	1.51658	1.2247	0.894
13	17.4	20.8	15.6	18	19.2	1.342	1.0954	0.54772	6.1237	2.49
14	3540	3628	3210	3712	3660	205.4	497.51	236.854	358.22	403.7

Tabla 1. Promedio y Desviación estándar de las catorce características morfológicas de *Prosopis laevigata* de cinco localidades del Estado de Guanajuato.

Nomenclatura: 1.- Perímetro del tronco. 2.- Altura de fuste. 3.- No. de ramas principales. 4.- Altura de árbol. 5.- Dosel. 6.- Pares de espinas en 20 cm. 7.- Longitud media de espinas. 8.- No. de hojas en 20 cm. 9.- No. de pinas. 10.- No. de folíolos por pina. 11.- Longitud de vainas. 12.- Grosor de vainas. 13.- Semillas por vainas. 14.- No. de vainas en 1/20 cm.

ANÁLISIS MORFOLÓGICOS*Análisis de componentes principales*

El análisis de Componentes principales dio como resultado que los cuatro primeros, constituyen el 69.801% de la varianza total (Tabla 2). El primero explica un 21.927 %, el segundo un 20.953%, el tercero el 14.430% y el cuarto el 12.491% de la varianza.

Tabla 2. Valores diferencias y proporciones de varianza para los cinco principales componentes entre 25 accesiones de *Prosopis laevigata*.

Componente	Total	% de la varianza	Varianza Acumulada
1	3.070	21.925	21.927
2	2.933	20.953	42.880
3	2.020	14.430	57.310
4	1.749	12.491	69.801

En el Primer componente, las variables que tienen mayor peso son: Perímetro del tronco, altura del árbol y dosel con valores mayores a 0.840, variables que revelan una mayor contribución a la estructura de follaje; correlacionó de forma inversa la altura de fuste (Tabla 3) Para el segundo componente, las variables más influyentes son: Longitud la vainas, No. de vainas en 1/20 de dosel y semillas por vaina con valores superiores a 0.630, de forma negativa lo hizo el grosor de vainas (-0.656). Las variables más destacadas del tercer componente son el número de pinas lo hace con un valor y de 0.766 y de forma negativa la longitud media de espinas (-0.747). Joseua *et al* (2007) encontraron que el número de pinas por hoja tuvieron gran participación en la formación de cinco grupos morfológicos. En cambio, Burghardt *et al.* (2000), determinaron que variables como largo y ancho de pina y longitud de foliolo evaluadas con análisis de componentes principales, fueron adecuadas para diferenciar plántulas de 8 especies de *Prosopis*, cultivadas en condiciones uniformes, en el Chaco semiárido del norte de Córdoba y sur de Santiago del Estero, Argentina. El cuarto componente está formado de las variables Pares de espinas en 20 cm y número de ramas principales con valores superiores a 0.760

Tabla 3. Matriz de componentes de la caracterización de Mezquite *Prosopis laevigata* de cinco localidades del Estado de Guanajuato.

	Componente			
	1	2	3	4
Perímetro del tronco cm	.908	.018	.017	.085
Altura de fuste cm	-.603	-.057	.146	.180
Número ramas principales cm	.224	.149	.379	.784
Altura de árbol m	.884	.011	.272	.138
Dosel cm	.848	.027	.341	-.110
Pares de espinas en 20 cm	-.186	-.142	-.189	.897
Longitud media de espinas mm	-.262	.322	-.747	.002
Número de hojas en 20 cm	-.022	.631	.387	.092
Número de pinas	.069	.163	.788	.011
Número de folíolos por pina	.442	.551	.256	-.471
Longitud de vainas cm	.119	.809	.188	-.085
Grosor de vainas mm	.054	-.656	.249	-.077
Semillas por vaina	.098	.635	-.371	.017
No. de vainas en 1/20 de dosel	-.008	.752	.001	-.124

Análisis de la distancia genética entre diversas accesiones

El dendrograma obtenido por el método de vinculación inter- grupos (Figura 1), divide en tres grupos a las plantas en estudio. El primero formado por 12 individuos de *Prosopis laevigata*, con un coeficiente de distancia de 10; mientras que para un segundo grupo está formado por 9 individuos ubicados, 3 procedentes de Silao, 2 de Yuriria, otros dos de Romita, uno procedente de Apaseo y oriundo de Pénjamo con una distancia de 17.85 y el tercer grupo formado por cuatro individuos, de los cuales se encuentran 2 en Yuriria, 1 en Silao y 1 en Apaseo lo cual puede interpretarse como que la variación de *Prosopis laevigata* es intermedia. En cambio Joseau, *et al* (2007) encontraron cinco grupos en su estudio hecho en Argentina con *Prosopis chilensis*, *P. flexuosa*, *P. alba* y *P. nigra*, a un nivel del 70%, que es el equivalente a una distancia de 17.5.

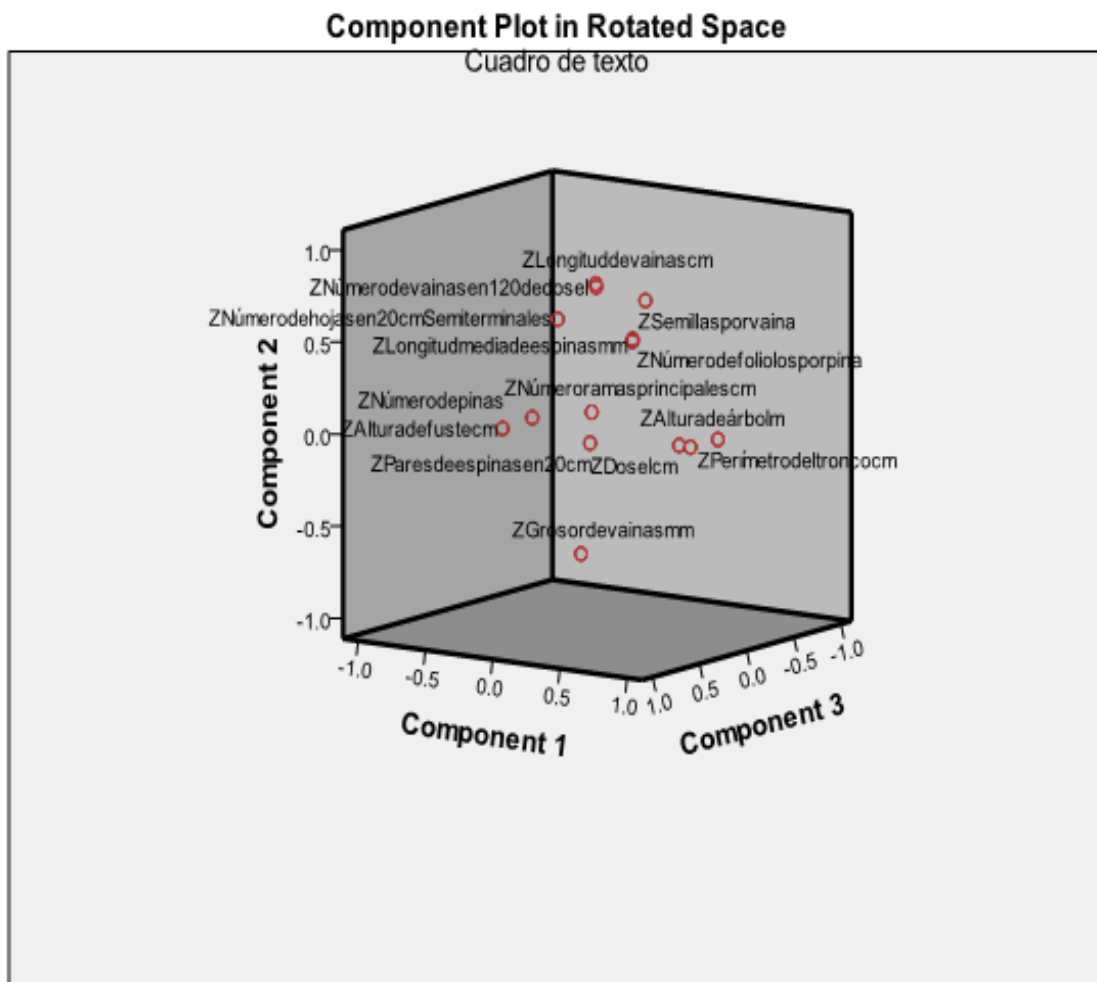
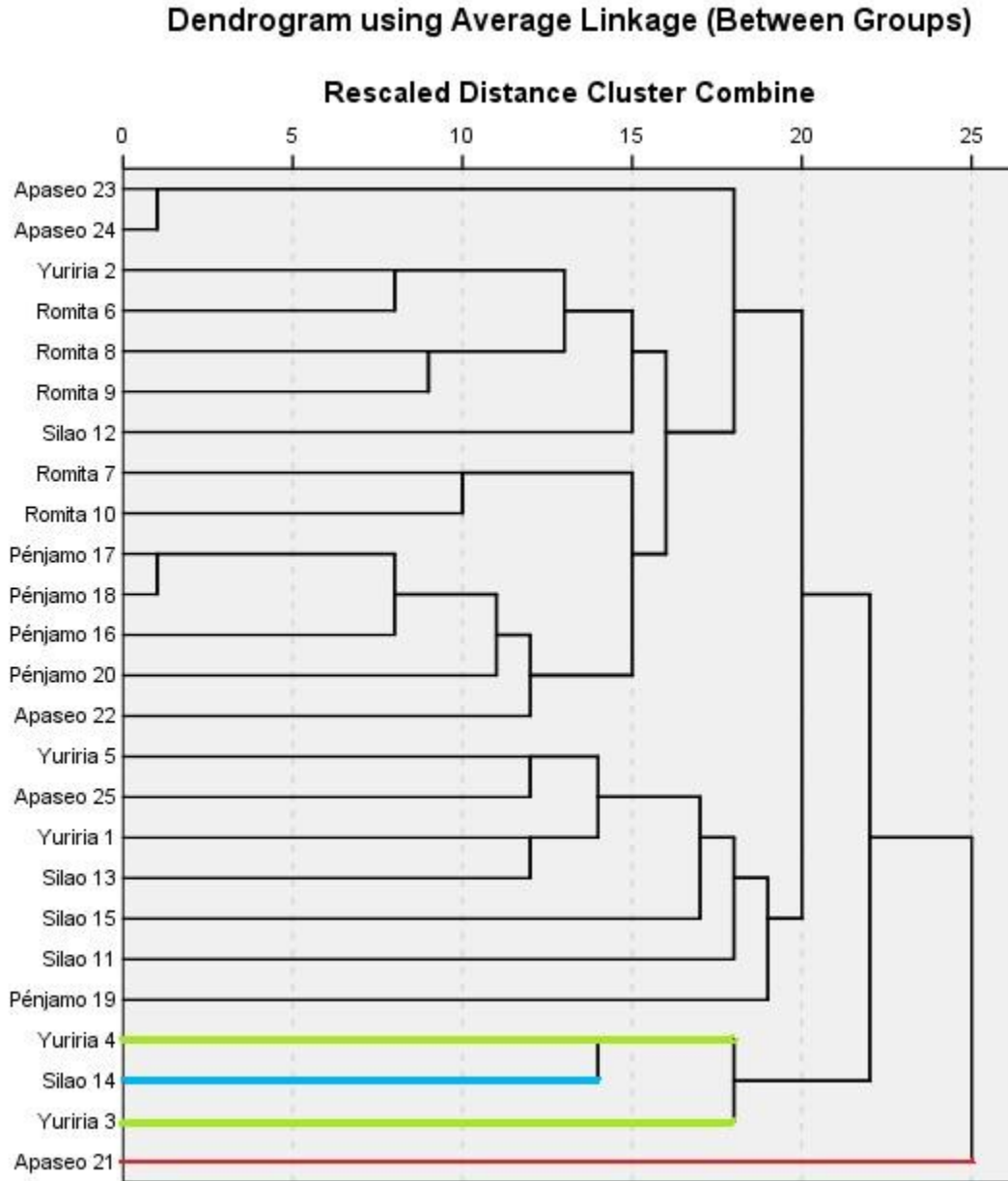


Figura 1. Dendrograma de distancia obtenido a partir de 25 accesiones de *Prosopis laevigata* de cinco localidades del Estado de Guanajuato.



CONCLUSIONES

1. El Mezquite procedente de Apaseo el Grande mostró la mayor variabilidad de entre las cinco localidades en estudio (Con una distancia que varía de 0.974 hasta 25 unidades de distancia genética).
2. Las accesiones oriundas de Pénjamo presentaron la segunda posición en cuanto a variabilidad, con una distancia genética de 1.0 hasta 20.833 unidades de distancia genética.
3. Las accesiones Provenientes de Silao mostraron la menor variabilidad genética (ser el grupo más compacto, con una distancia que va desde 12.66 hasta 15 unidades de distancia genética).
4. Se requiere continuar los estudios para otras localidades del Estado de Guanajuato
5. Deben hacerse estudios comparativos de plantas madre y su descendencia.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad de Guanajuato y al Sistema Nacional de Recursos Filogenéticos para la alimentación y la Agricultura (SNICS, SAGARPA), por el apoyo para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Burghardt, Alicia D.Brizuela, M.M., Palacios, R.A. (2000). Variabilidad en plántulas de algunas especies de *Prosopis* L. (Fabaceae). En busca de descriptores morfológicos *Multequina* [en línea], [fecha de consulta: 5 de marzo de 2018] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=42800904> ISSN 0327-9375
2. Franco, T., e Hidalgo, R., (2003), En Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín Técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia, 89 pp.
3. Joseau, M.J. et al (2007). Caracterización morfológica y genética de poblaciones del género *Prosopis* del Chaco semiárido del norte de Córdoba y sur de Santiago del Estero. *Ciencia e Investigación Forestal-Instituto Forestal/Chile*. Volumen 13, número 3. 2007. 427-448.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FITORREMIADORA DE *PISTIA STRATIOTES* L. EN AGUA CONTAMINADA CON PLOMO (PB).

Erick Rodolfo López Almanza, Laura Edith Aguilera Segoviano

Instituto Tecnológico Superior de Abasolo. erick.almanza@tecabasolo.edu.mx

RESUMEN

En Guanajuato las fábricas de alimentos, bebidas, tabaco y ropa son la principal fuente de contaminación del agua y el aire de acuerdo con el Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes de Guanajuato. La industria textil contamina el 38% del agua, la industria alimenticia contamina el 34.1%, la industria de bebidas y tabaco el 21.7%, el curtido el 5.1%, la producción de aparatos eléctricos y vehículos el 0.2 %; en cada caso, los principales contaminantes emitidos por estas industrias son plomo, níquel, cromo, cadmio, cianuro, arsénico y mercurio, de los cuales destaca el plomo ya que representa el 56.9% de la contaminación del agua. La lechuga de agua (*Pistia stratiotes*), es una planta hiperacumuladora, se ha empleado en la fitorremediación de sitios contaminados con Cr, Cu, Cd y Hg, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de usar *Pistia stratiotes* como organismo fitorremediador de Pb. Se usaron tres tratamientos distintos, el tratamiento uno (T1) conformado por 6 mg/L de Pb, el tratamiento dos (T2) de 0.5 mg/L de Pb y el tratamiento tres (T3) de 0.005 mg/L de Pb. Cada disolución se disolvió en diez litros de agua y se les colocaron 5 plántulas de *P. stratiotes* a cada tratamiento, se usó un control negativo el cual no tenía la presencia del contaminante. Los tratamientos se monitorearon durante dos meses, se utilizó un método colorimétrico simple modificado para determinar plomo, observando una reducción del 46.72%, 99.6% y 99.2% respectivamente para cada concentración. Lo que indica que *P. stratiotes* puede usarse como una planta hiperacumuladora para la remoción de Pb, con un bajo impacto ambiental debido a que la especie utilizada es de fácil propagación y eliminación.

INTRODUCCIÓN

En la última década, la contaminación por plomo (Pb) ha cobrado una mayor relevancia debido a que las afectaciones a la salud son severas, la exposición a este metal puede provocar desde trastornos digestivos, dolores musculares, calambres y presión arterial elevada eso en condiciones agudas, en condiciones crónicas puede causar anemia, como consecuencia de que el plomo inhibe la síntesis del grupo hemo de la hemoglobina¹. También se observan alteraciones en los sistemas nerviosos central y periférico, hígado, riñón y tejido óseo., hasta afectaciones más severas al cerebro y al sistema nervioso, se ha reportado que en concentraciones mínimas llega a provocar anemia en mamíferos y su presencia en ecosistemas acuáticos puede llegar a provocar perturbaciones en los organismos presentes y también puede entrar a las cadenas alimenticias, provocando una bioacumulación. Por tal motivo se plantea el uso de la biorremediación para el tratamiento de este contaminante. La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza el potencial metabólico de organismos vivos (plantas, algas, hongos y bacterias) para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en suelo, agua y aire². Uno de los mecanismos de la biorremediación es la fitorremediación la cual es un proceso que utiliza plantas (terrestres o acuáticas) para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en agua, suelos, lodos y sedimentos, actualmente se tiene un aproximado de 400 especies de plantas que poseen la capacidad de absorber alguna sustancia. Un claro ejemplo es *Pistia stratiotes* conocida comúnmente como lechuga de agua, la cual es una planta flotante que crece naturalmente en lagunas y arroyos en regiones con climas tropicales a templados, esta planta se considera que es una planta hiperacumuladora, se ha reportado que *P. stratiotes* tolera altas concentraciones de Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn, donde mostro una mayor tolerancia a Zn y la menor a Hg³. El plomo se utiliza comúnmente en la fabricación de productos tales como baterías, pigmentos, aleaciones, cerámicas, plásticos, municiones, soldaduras, cubiertas de cables, plomadas y armamento. También se utiliza en la elaboración de equipo para la fabricación de ácido sulfúrico, refinamiento de petróleo, aditivo de gasolinas y procesos de halogenación⁴. En el estado de Guanajuato, hay 22 puntos críticos de contaminación de agua, aire y suelo; los ríos Temascalío, Turbio, Batán, Laja, Lerma y la presa La Purísima están contaminados con raticidas, solventes petroquímicos, plomo, níquel, mercurio, arsénico y diversos desechos industriales⁵. Aunado a esto

se ha reportado la presencia de plomo, en presas de jales mineros ubicadas en la región III-Centro-Oeste del estado de Guanajuato, con valores superiores a los permitidos por la normatividad ambiental⁶.

METALES PESADOS

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad alta. No todos los metales de densidad alta son especialmente tóxicos en concentraciones normales (algunos de ellos son necesarios para el ser humano). No obstante, hay una serie de metales pesados más conocidos por su tendencia a representar serios problemas medioambientales el mercurio (Hg), el plomo (Pb), el cadmio (Cd) y el talio (Tl), así como el cobre (Cu), zinc (Zn) y cromo (Cr). En ocasiones se incluye al hablar de contaminación por metales pesados a otros elementos tóxicos ligeros como el berilio (Be) o el aluminio (Al), o algún semimetal como el arsénico (As)⁷.

PLOMO

El plomo es un metal tóxico presente de forma natural en la corteza terrestre. Su uso generalizado ha dado lugar en muchas partes del mundo a una importante contaminación del medio ambiente, un nivel considerable de exposición humana y graves problemas de salud pública. Los niños de corta edad son especialmente vulnerables a los efectos tóxicos del plomo, que puede tener consecuencias graves y permanentes en su salud, afectando en particular al desarrollo del cerebro y del sistema nervioso. El plomo también causa daños duraderos en los adultos, por ejemplo, aumentando el riesgo de hipertensión arterial y de lesiones renales. En las embarazadas, la exposición a concentraciones elevadas de plomo puede ser causa de aborto natural, muerte fetal, parto prematuro y bajo peso al nacer, y provocar malformaciones leves en el feto⁸.

Afectaciones al medio ambiente por plomo

El plomo se encuentra de manera natural en el medio ambiente, pero las afectaciones a este se dan por las grandes concentraciones del metal producto de la actividad humana. Las partículas grandes precipitarán al suelo o a las aguas superficiales, las partículas más pequeñas viajarán largas distancias a través del aire y permanecerán en la atmósfera y posteriormente volverán a caer a la tierra cuando llueva. El plomo se acumula en los cuerpos de los organismos acuáticos y organismos del suelo, experimentando efectos en su salud por envenenamiento debido a la prolongada exposición al metal⁹. Los efectos sobre los crustáceos pueden tener lugar incluso cuando solo están presentes pequeñas concentraciones de Pb dentro de su hábitat. En el caso del fitoplancton sus funciones pueden ser perturbadas con la presencia del Pb. El fitoplancton es una fuente importante de producción de oxígeno en mares y muchos grandes animales marinos lo ingieren, en el caso del ambiente terrestre las plantas se ven afectadas debido a que el Pb limita la síntesis de clorofila y concentraciones altas perjudican su crecimiento¹⁰.

Fitorremediación

La fitorremediación es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en agua, suelos, lodos y sedimentos, por medio de la utilización de plantas que tengan la capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar dichas sustancias a formas menos tóxicas, esta técnica tiene más ventajas frente a las tradicionales técnicas físico-químicas, entre las que se puede destacar su menor costo económico, su aproximación más respetuosa con los procesos ecológicos del ecosistema edáfico, y el hecho de ser una tecnología social, estética y ambientalmente más aceptada¹¹. Puede aplicarse tanto in situ como ex situ. El mecanismo de la fitorremediación a su vez cuenta con una serie de fitotecnologías las cuales se basan en los mecanismos fisiológicos básicos que tienen lugar en las plantas y en los microorganismos asociados a ellas, tales como: transpiración, fotosíntesis, metabolismo y nutrición que pueden aplicarse para la degradación de contaminantes orgánicos o inorgánicos, estos mecanismos comprenden la fitoextracción, fitoestabilización, fitoinmovilización, fitovolatilización, fitodegradación, rizofiltración y rizodegradación¹².

Lechuga de agua (Pistia stratiotes)

La lechuga de agua o repollito de agua (*Pistia stratiotes*) es una planta flotante que crece naturalmente en lagunas y arroyos de las regiones tropicales a templadas del mundo, por su gran valor ornamental pueden utilizarse para decorar acuarios, invernaderos, pequeños estanques o lugares muy húmedos situados en la proximidad de las corrientes de agua (Fig. 1), siendo además

una gran ayuda para controlar las floraciones masivas de algas, con quienes compiten por los alimentos disponibles en el agua¹³.



Fig. 1. Lechuga de agua (*Pistia stratiotes*)

La lechuga de agua se considera una planta hiperacumuladora, ya que se ha empleado en la fitorremediación de sitios contaminados con Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni y Zn. Se ha reportado el uso de *P. stratiotes* para la fitorremediación de Cobre II, demostrando que al alcanzar su etapa adulta y al ser removida a una solución acuosa con Cobre II, removió el 70% del contenido de cobre en un periodo de 6 horas, por lo que es capaz de descontaminar aguas residuales con la presencia de este metal¹⁴. También se ha demostrado en estudios realizados en estanques que *P. stratiotes* posee una capacidad superior de remoción de DBO en comparación con plantas de lodos activados¹⁵. Por esta razón se propone en este proyecto el uso de esta planta para la remoción plomo en agua contaminada con dicho metal.

PARTE EXPERIMENTAL

Se prepararon tres soluciones de concentración conocida de plomo para utilizarse en los tratamientos con la planta, para esto se utilizó el compuesto $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ya que el plomo presente en esta molécula es plomo divalente. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de las soluciones preparadas con el compuesto y el valor correspondiente al Pb^{+2} .

	Solución 1	Solución 2	Solución 3
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	12 mg/l	2 mg/l	0.1 mg/l
Pb^{+2}	7.508 ppm	1.2513 ppm	0.0625 ppm

Tabla 1. Concentración de las soluciones preparadas

Posteriormente se establecieron los tratamientos de remediación utilizando peceras con capacidad de 20 litros, el primer tratamiento (T1) estuvo conformado por: *P. stratiotes* + solución 1 (7.058 ppm), el segundo tratamiento (T2) estaba conformado por: *P. stratiotes* + solución 2 (1.2513 ppm), el tercer tratamiento (T3) estaba conformado por: *P. stratiotes* + solución 3 (0.0627 ppm), se usó también un control, conformado únicamente por la planta. Los tratamientos fueron monitoreados durante un lapso de tres semanas, analizando semanalmente la concentración de Pb.

Para determinar la concentración de plomo, se usó una modificación de un método para determinar Pb de esmaltes cerámicos¹⁶, el cual es un método colorimétrico simple para la determinación cuantitativa de plomo en soluciones acuosas. El método consiste básicamente en precipitar plomo del acetato como sulfuro de plomo y de esta forma tener una coloración oscura a mayor concentración de plomo. La determinación cuantitativa de la concentración de plomo se obtiene por medio de la comparación visual de la muestra a analizar con las muestras patrón con una concentración ya conocida. Se colocaron 200 gramos aproximadamente de piritita de hierro en un matraz (matraz I), enseguida se agregaron 150 ml de agua en otro matraz (matraz II), y mediante un embudo de vidrio colocado en el matraz I se añadió ácido clorhídrico (50% en volumen), obteniendo de esta forma ácido sulfhídrico gaseoso. Las muestras patrón y las muestras tomadas de los tratamientos semanalmente se sulfidaron al momento del burbujeo y precipitaron por completo el sulfuro de plomo, obteniendo coloraciones que van del amarillo claro (2 ppm) al café (10 ppm).



Fig. 2 Dispositivo de sulfhidración

Las muestras patrón estuvieron conformadas por las siguientes concentraciones de Pb, las cuales se muestran en la Tabla 2.

Muestra	Concentración (ppm)
A	1000
B	20
C	10
D	8
E	6
F	4
G	2
H	0.5
I	0.05
J	0.005

Tabla 2. Concentración de las muestras patrón

RESULTADOS

Las muestras patrón adquirieron las coloraciones deseadas que van de un café oscuro pasando por varios tonos de café hasta llegar a un color casi transparente con lo que se pudo realizar la comparación con las muestras problema, tal como se muestra en la Fig.3.



Fig.3 Sulfhidración de las muestras patrón.

Utilizando las muestras patrón, se comparó las muestras sulfhidradas de los tratamientos, en la tabla 3, se muestran las variaciones de la concentración de plomo en el transcurso del lapso del tratamiento.

Tratamiento	Concentración inicial (ppm)	Semana 1 (ppm)	Semana 2 (ppm)	Semana 3 (ppm)	Porcentaje de remoción (%)
T1	7.508	6	4	---	46.72
T2	1.2513	0.5	0.005	---	99.6
T3	0.0625	0.005	0.0005	---	99.2

Tabla 3. Concentración semanal de plomo y porcentaje final de remoción.

Como se puede observar en la tabla anterior, no se muestran los datos de la semana tres ya que no hubo variación en la concentración del ion, tal vez por una saturación en las raíces de la planta o un posible daño en la fisiología de la planta provocada por el contaminante.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede inferir que *Pistia stratiotes* puede utilizarse como organismo fitorremediador para el tratamiento de cuerpos de agua contaminados con plomo. Como se puede apreciar el tratamiento que en el cual se tuvo una mayor remoción del contaminante fue el tratamiento T2, el cual contiene la concentración intermedia, si bien en los tratamientos T1 y T3 también mostro una notoria remoción se recomienda utilizar este proceso para tratar aguas contaminadas en concentraciones con rangos de 0.05 ppm hasta 2 ppm aproximadamente para que el proceso sea más eficaz y se remueva un porcentaje mayor del Pb. En el caso de concentraciones mayores a las indicadas, *P. stratiotes* se podría utilizar como parte de un tren de tratamientos para contrarrestar el porcentaje menor de remoción. Otra forma de aumentar este porcentaje podría ser aumentar el número de plantas utilizadas en el tratamiento. Por el tipo de planta utilizada en el proceso, se cree que el mecanismo de fitorremediación realizado por *P. stratiotes* es una rizofiltración o una fitoacumulación. Con esto, se demuestra que *Pistia stratiotes* puede ser usada como una nueva opción de remediación para el tratamiento de aguas contaminadas con plomo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Universidad Politécnica de Valencia. (2012). Manejo del plomo, sus derivados y sus residuos. Recuperado 18 abril, 2018, de https://www.sprl.upv.es/IOP_SQ_38.htm
2. Castillo Rodríguez, F. (2005). *Biología ambiental* (No. 660.6 B616b). Madrid, ES: Edit. Tébar.
3. Gratão, P. L., Prasad, M. N. V., Cardoso, P. F., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). *Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17*(1), 53-64.
4. ¿Cuáles son los usos del Plomo? (2015). Recuperado 18 April 2018, a partir de <http://www.retc.cl/cuales-son-los-usos-del-plomo/>
5. García, C. (2014). En Guanajuato, 22 puntos críticos de contaminación. *La Jornada*, p. 23. Recuperado a partir de <http://www.jornada.unam.mx/2014/01/02/estados/023n1est>
6. Córdova de la Cruz, S., & Esparza Claudio, J. (2016). Generación de escenario de potencial de contaminación en el acuífero Silao-Romita, en Guanajuato. *REALIDAD, DATOS Y ESPACIO REVISTA INTERNACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA, 7*(2), 40-56. Recuperado a partir de <http://www.inegi.org.mx/rde/2016/05/02/generacion-de-escenario-de-potencial-de-contaminacion-en-el-acuifero-silao-romita-en-guanajuato/>
7. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (s.f.). Metales pesados. Recuperado 19 abril, 2018, de http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/metales_pesados.aspx
8. OMS. (2017, agosto). Intoxicación por plomo y salud. Recuperado 19 abril, 2018, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>
9. Burger, M., & Pose Roman, D. (2010). *Plomo Salud y Ambiente- Experiencia en Uruguay* (pp. 107-104). Montevideo: Organización Panamericana de la Salud.
10. Heller, J. (2017). *Intoxicación con plomo: MedlinePlus enciclopedia médica. Medlineplus.gov*. Recuperado 20 April 2018, a partir de <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002473.htm>

11. Crespo, C. G., Epelde, L., & Soto, J. M. B. (2008). Fitorremediación: una tecnología verde para la recuperación de suelos contaminados. *El Ecologista*, (57), 40-41.
12. Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 14(2), 597-612.
13. Velde, S., & Dauner, E. (1999). *El Libro de las plantas acuáticas*. Barcelona: Hispano Europea.
14. Torres, G., Navarro, E. A., Languasco, J., Campos, K., & Cuizano, N. (2007). Estudio preliminar de la fitorremediación de cobre divalente mediante *Pistia stratioides* (lechuga de agua). Descargado de http://cienciaescolar.net/proyectos/wpcontent/uploads/2009/09/Art_14_Torres_lechuga_agua. Pdf el, 15.
15. GARCIA TRUJILLO, Z. (2012). *Comparación y evaluación de tres plantas acuáticas para determinar la eficiencia de remoción de nutrientes en el tratamiento de aguas residuales domésticas*. Universidad Nacional De Ingeniería.
16. Díaz, A., García, J., Ocampo, J., & Valdez, A. (1980). MÉTODO COLORIMÉTRICO SIMPLE PARA DETERMINAR PLOMO SOLUBLE EN ESMALTES CERÁMICOS. *Revista Mexicana De Física*, 26(3), 525-530. Recuperado a partir de https://rmf.smf.mx/pdf/rmf/26/3/26_3_525.pdf

ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DE *Trichoderma* spp. EN CULTIVO DE SORGO

Pablo Flores Cervantes, Karla Ivonne González Martínez, Virginia Angélica Robinson Fuentes y Gerardo Vázquez Marrufo

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

El sorgo (*Sorghum bicolor*) es un cereal que pertenece a la familia de las gramíneas, y representa el cuarto cereal en importancia en siembra a nivel mundial después del maíz, arroz y trigo. Se utiliza para el consumo humano directo, la producción animal mediante la utilización del grano y de la planta como forraje. México es el segundo productor mundial de sorgo, produciendo anualmente 6 millones de toneladas promedio. Los estudios sobre la comunidad de hongos asociada a cultivos de sorgo son escasos. Sólo se han analizado especies fúngicas de uno o dos compartimentos de la planta, de un agroecosistema y no se comparan entre los compartimentos. En este trabajo se analizan las especies fúngicas en los distintos compartimentos para comprender la asociación planta-microorganismo y así encontrar especies de interés agronómico, biotecnológico e industrial, como son las especies del género *Trichoderma*. De un cultivar de sorgo controlado, se seleccionaron 5 cuadrantes de los que se obtuvieron muestras de tejido foliar, raíz y suelo, por triplicado. Se usó agar papa dextrosa suplementado (rosa de bengala, cloranfenicol y sulfato de estreptomina) para el aislamiento directo y agar papa dextrosa suplementado (cloranfenicol) para el aislamiento del cultivo axénico. Se seleccionaron aquellos aislados que presentaban características morfológicas distintas de tal forma que se obtuvieron 49 aislados endófitos: 27 aislados de tejido foliar, 22 aislados de raíz y 99 aislados de suelo. Del total de aislados, se encontró que había especies del género *Trichoderma*: 5 de Tejido foliar, 4 de raíz y 20 de suelo cuya morfología es diferente. Lo anterior indica que cada nicho o compartimento presenta su propia comunidad y esto habla de la versatilidad de especies del género *Trichoderma* en un mismo cultivo.

INTRODUCCIÓN

El sorgo es un producto agrícola que se utiliza para diversos fines que incluyen el consumo humano directo, la producción animal mediante la utilización del grano y de la planta como forraje, por lo que es ampliamente cultivado alrededor del mundo, produciéndose alrededor de 60 millones de toneladas anuales promedio en los últimos 10 años hasta el 2016. La producción mundial de sorgo se concentra en ocho países, siendo Estados Unidos el principal cultivador con una participación del 18 por ciento del total seguido de Nigeria y México, que participan con alrededor del 10% cada uno¹. El segundo lugar que ocupa México como productor global de sorgo lo debe a una producción anual de 6 millones de toneladas promedio, pero, además, México es el segundo consumidor mundial de este grano, destinándose el 95% a consumo forrajero y el resto a consumo humano y usos en la industria. La producción nacional se concentra principalmente en Tamaulipas, Guanajuato, Sinaloa, Michoacán y Nayarit. Siendo Michoacán el 4º productor nacional de dicho cereal, produciendo 0.6 millones de toneladas anuales promedio¹. Una amplia gama de hongos ha sido identificada como fitopatógenos o productores de micotoxinas asociados a cultivos de sorgo, siendo las especies más comunes de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Chaetomium* y *Curvularia*, otros géneros representativos son *Colletotrichum*, *Periconia*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichotecium*, *Trichoderma* y *Cephalosporium*. Los cuales se pueden ser endófitos de raíz y en tejido foliar así como también encontrarlos en suelo².

Los estudios sobre la comunidad de hongos asociada a cultivos de sorgo son escasos. Recientemente, empleando una combinación de pirosecuenciación y secuenciación de Sanger de las regiones ITS y 18S de rDNA, así como el aislamiento en cultivo axénico, se identificaron 33 especies de ascomicetes asociados a semillas y plántulas de sorgo crecidas *in vitro*³. Otro estudio basado únicamente en el aislamiento en cultivo axénico identificó a aislados de *Aspergillus* (28.7%), *Alternaria* (22.9%) y *Penicillium* (13.4%) como los más abundantes en tejidos de plantas de sorgo⁴. Los hongos fitopatógenos asociados al cultivo de sorgo en México son *Fusarium moniliforme*^{5, 6}, *Macrophomina phaseolina*^{7, 6}, *Sporisorium reilianum*, *Peronosclerospora sorghi*, *Claviceps africana*⁷ y *Sclerotium rolfsii*⁸. En el caso particular de Michoacán, los fitopatógenos asociados a sorgo, incluidas plantas de *Sorghum* sp., *S. bicolor* y *S. vulgare*, son *Peronosclerospora sorghi*, *C. africana*,

F. moniliforme, *Cercospora sorghi* y *Sporisorium reilianum*⁹. En México se han obtenido aislados de *Trichoderma* spp. a partir de suelo en donde se ha cultivado sorgo. Las especies identificadas mediante criterios morfológicos en combinación con el análisis de la secuencia ITS fueron *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. koningiopsis* y *T. citrinoviride*¹⁰. Las especies del género *Trichoderma* destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo^{11, 12}, debido a una eficiente colonización de la rizósfera estableciéndose rápidamente en las comunidades microbianas de la misma, lo que les permite ejercer un control sobre la micoflora patogénica y favorecer la salud de la planta mediante la estimulación del crecimiento¹³. La diversidad de la comunidad de especies de *Trichoderma* en distintos estudios muestra resultados contrastantes, dependientes de la escala del muestro y el tipo de nicho/compartimento del ecosistema analizado. Así, al analizar la rizósfera de áreas con distinto tipo de vegetación a lo largo de la isla de Tenerife (España), se encontró solo a las especies *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. cf. tomentosum*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. viride* y *T. viride* Ve'¹⁴. Al realizar la comparación entre dos bosques templados del centro de Europa, el análisis de la comunidad de suelo de *Trichoderma* mostró la presencia de 15 especies distintas, con predominancia de *T. asperellum* y dos taxa posiblemente nuevos para el género¹⁵. En relación a áreas agrícolas, el análisis de rizósfera de plantaciones de café en Etiopía mostró la presencia de las especies *T. harzianum sensu lato*, *T. hamatum*, *T. asperelloides*, *T. spirale*, *H. atroviridis/T. atroviride*, *H. koningiopsis/T. koningiopsis*, *T. gamsii*, *T. longibrachiatum*¹⁶. A nivel de planta, se ha encontrado que en hojas de cacao prácticamente la única especie presente es *T. asperellum*¹⁷. Por otra parte, evidencia filogenética y ecológica indica que, dentro de un mismo ecosistema, a nivel global, existen especies de *Trichoderma* spp. específicas de tejido foliar de las plantas, así como aquellas que son específicas de suelo¹⁸.

La evidencia bibliográfica indica que, al analizar los compartimentos de un ecosistema, particularmente de un agro-ecosistema, se encontrará baja diversidad de especies de *Trichoderma* en cada compartimento analizado, pero las especies serán distintas entre éstos. Adicionalmente, cuando se realizan análisis para evaluar la comunidad de *Trichoderma* spp. en agroecosistemas, se estudia de manera independiente a las especies endófitas de raíz de las de tejido foliar y las de suelo, por lo que a la fecha no existe ningún estudio en el que de manera simultánea se estudie la diversidad de especies en los tres tipos de muestras.

PARTE EXPERIMENTAL

Descripción del área de estudio y muestreo:

Cultivo de sorgo controlado, en el municipio de Tarímbaro del Estado de Michoacán, ubicado en las coordenadas 19°48' de latitud norte y 101°10' de longitud oeste, a una altura de 1,860 metros sobre el nivel del mar. Su clima es templado con lluvias en verano. El área de cultivo es de 25000 m², tiene una precipitación pluvial anual de 609.0 milímetros y una temperatura promedio de 25° C¹⁹.

Obtención de las muestras:

El muestreo se realizó estableciendo cinco transectos de 13 m de ancho sobre los cuales se caminó en zigzag tomando tres muestras de suelo y tres plantas por transecto. El muestreo de suelo se realizó con un muestreador de 50 cm de longitud y 20 cm de diámetro. Las muestras de plantas y de suelo se colocaron en bolsa de plástico para su traslado al laboratorio. El suelo se secó y se procesó para hacer diluciones en la misma semana de colecta de las muestras. Las plantas se lavaron y para el aislamiento de hongos se procesaron en la misma semana de colecta, como se describe más adelante.

Aislamiento de hongos de muestras foliares y de raíz:

Para el aislamiento de hongos de tejido foliar y de raíz se hicieron cortes de 5 mm de las muestras foliares o raíz con signos de infección y sin daño aparente. Estos fragmentos se desinfectaron con solución de Hipoclorito de Sodio al 5% (p/v) y posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada. Las muestras se secaron con papel estéril y se colocaron en los medios correspondientes descritos, incubando de 2 a 7 días a 28 °C.

Aislamiento de hongos de muestras de suelo:

Las 3 muestras obtenidas por transecto se homogeneizaron en una de la cual se tomó 1g y se diluyó en 10 mL de agua destilada, de dicha suspensión se realizaron diluciones seriales para obtener una

dilución 10^{-4} . De cada dilución se tomó una alícuota de 250 μL la cual se distribuyó homogéneamente en los medios de cultivo y se incubaron de 2 a 7 días a 28 °C.

Medios de cultivo:

Para el aislamiento de cepas fúngicas del tejido foliar y de raíz se usó medio agar dextrosa papa (PDA, Bioxon USA) suplementado con rosa de bengala (0.02g/L), cloranfenicol (0.3 g/L) y sulfato de estreptomina (0.02 g/L), ajustado a un pH de 5.0.

Para aislar cepas del género *Trichoderma* de muestras de tejido foliar, de raíz y suelo; se usó el medio selectivo de *Trichoderma* (TSM) el cual contiene por litro: 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9 g de K_2HPO_4 , 1.0 g de NH_4NO_3 , 0.15 g de KCl, 0.15 g de rosa Bengala, 3 g de glucosa, 20 g de agar y 950 mL de agua destilada. Los ingredientes antimicrobianos y fungicidas (todas las cantidades son por litro) son: 0,25 g de cloranfenicol, 9.0 mL de solución madre de estreptomina (1% p / vol), 0,2 g de quintozeno y 1,2 mL de propamocarbe (772 g de ingrediente activo por litro). Todo en 40 mL de agua destilada estéril y la mezcla se añade al medio basal enfriado.

RESULTADOS

Se obtuvieron aislados de cada uno de los 5 compartimentos del sorgo que se numeran en la Tabla 1. Las letras que representan los aislados de cada compartimento son: F de tejido foliar, R de Raíz y S de Suelo; mientras que los números contiguos a las letras, representan al transecto. La comunidad representa el número total de aislados y la diversidad, el número de aislados distintos entre sí por transecto. De los aislados obtenidos, se buscaron aquellos que presentaban similitud morfológica; de estos, se seleccionó un aislado y el resto se descartaron. Así es que sólo se trabajó con aquellos que eran distintos por cada transecto. De esta manera, se seleccionaron las especies del género *Trichoderma*.

En la Tabla 1 se observa que hay un mayor número de aislados en las muestras de suelo, aunque no hay diversidad, predominando las especies de *Trichoderma*. En el caso de las muestras de tejido foliar, hay una mayor comunidad de hongos que en la raíz así como una ligeramente mayor comunidad; sin embargo, el número de especies de *Trichoderma* es prácticamente el mismo en ambos tipos de tejido. El siguiente paso consistirá en identificar a las especies de *Trichoderma* y analizar su diversidad.

Tabla 1: Aislados fúngicos de un cultivo de sorgo.

Nicho/Transecto	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
Comunidad	7	9	1	6	8	7	6	9	5	6	1	2	2	2	1
			2								8	2	3	0	6
Diversidad	5	5	8	4	5	7	4	5	3	3	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i>			5					4						20	

CONCLUSIONES

Cada uno de los compartimentos del cultivo de sorgo aquí estudiado, muestra una interesante diversidad en su comunidad fúngica. Existen diferencias entre el número de los aislados en cada compartimento y se observó que existe baja diversidad de especies del género *Trichoderma* para tejido foliar y raíz (5 y 4, respectivamente) en comparación con el número de especies en suelo (20).

BIBLIOGRAFÍA

1. SAGARPA (secretaría de agricultura, ganadería desarrollo rural pesca y alimentación), "Panorama Agroalimentario, Sorgo 2016". Septiembre, 2016 [en línea] Disponible en URL: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200640/Panorama_Agroalimentario_Sorgo_2016.pdf [Consulta: 25 de septiembre del 2017].
2. FAO Y OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura y Organización Mundial de la Salud), "Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del CODEX sobre contaminantes de los alimentos: documento de debate

- sobre la presencia de hongos y micotoxinas en el sorgo". *Comisión del Codex Alimentarius*. Vol. 9, 2012, pp. 1-59.
3. M. S. Stokholm, E. G. Wulff, E. P. Zida, I. G. Thio, J. B. Néya, R. W. Soalla, S. E. Głazowska, M. Andresen, H. B. Topbjerg, B. Boelt & O. S. Lund, "DNA barcoding and isolation of vertically transmitted ascomycetes in sorghum from Burkina Faso: *Epicoccum sorghinum* is dominant in seedlings and appears as a common root pathogen". *Microbiological research*. Vol. 191, 2016, pp. 38-50.
 4. Del Palacio, A. Mionetto, L. Bettucci, & D. Pan, "Evolution of fungal population and mycotoxins in sorghum silage". *Food Additives & Contaminants: Part A*. Vol. 33, 12, 2016, pp. 1864-1872.
 5. J. L. Martínez-Ramírez, A. Pescador-Rubio, R. Lezama-Gutiérrez, O. Rebolledo-Domínguez, J. Molina-Ochoa, M. López-Lavín & A. Betancourt-Vallejo, "Aspectos epidemiológicos de *Fusarium moniliforme* causante del tizón de la panoja del sorgo". *Avances en Investigación Agropecuaria*. Vol. 9, 3, 2005, pp.11-18.
 6. S. Ramírez-Rojas, F. Perdomo-Roldán & F. D. J. Canizalez, "Etiología de la pudrición del tallo del sorgo en el estado de Morelos, México". *Investigación Agropecuaria*. Vol. 10, 1, 2013, pp. 43-48.
 7. A. Díaz-Franco & N. Montes-García, "La fitopatología en la región semiárida de Tamaulipas, México: reseña histórica". *Revista mexicana de fitopatología*. Vol. 26,1, 2008, pp. 62-70
 8. J. Hernández-Jiménez, R. Montes-Belmont, H. E. Flores-Moctezuma, R. A. Nava-Juárez, & J. Chanona-Pérez, "Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo". *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 22, 3, 2004, pp. 345-350.
 9. S. P. Fernández-Pavía, G. Rodríguez-Alvarado, N. Gómez-Dorantes, M. D. R. Gregorio-Cipriano, & Y. L. Fernández-Pavía, "Enfermedades en plantas en el Estado de Michoacán". *Biológicas* (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Vol. 14, 2, 2012, pp. 75-89.
 10. C. P. Larralde-Corona, M. R. Santiago-Mena, A. M. Sifuentes-Rincon, I. C. Rodríguez-Luna, M. A. Rodríguez-Perez, K. Shirai & J. A. Narvaez-Zapata, "Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean". *Applied microbiology and biotechnology*. Vol. 80, 1, 2008, pp. 167.
 11. D. Infante, B. Martínez, N. González y Y. Reyes, "Mecanismos de Acción de *Trichoderma* Frente a Hongos Fitopatógenos". *Revista de protección ambiental*. Vol. 24, 1, 2009, pp. 14-21.
 12. J. L. Hernández, M. I. Sánchez, J. G. García, N. Mayek, J. M. González, y J. C. Quiroz, "Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma spp* nativos del noreste de México". *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. XIII, 2, 2011, pp. 176-185.
 13. F. Vinale, K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, S. L. Woo, & M. Lorito, "Trichoderma plant pathogen interactions". *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 40, 2008, pp. 1-10.
 14. C. Zachow, C. Berg, H. Müller, R. Meincke, M. Komon-Zelazowska, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek & G. Berg, "Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors". *The ISME Journal*. Vol. 3, 1, 2009, pp. 79-92.
 15. M. A. Fried & I.S. Druzhinina, "Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*. Vol. 158, 2012, pp. 69-83.
 16. T. Belayneh-Mulaw, C. P. Kubicek & I. S. Druzhinina, "The rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*". *Diversity*. Vol. 2, 4, 2010, pp. 527-549.
 17. A. Rosmana, G. J. Samuels, A. Ismaiel, E. S. Ibrahim, P. Chaverri, Y. Herawati, & A. Asman, "*Trichoderma asperellum*: a dominant endophyte species in cacao grown in Sulawesi with potential for controlling vascular streak dieback disease". *Tropical Plant Pathology*. Vol 40, 1, 2015, pp. 19-25.

-
18. P. Chaverri & G. J. Samuels, "Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology". *Evolution*. Vol. 67, 10, 2013, pp. 2823-2837.
 19. INAFED. "Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México". [Base de datos en línea] Septiembre 2017, disponible en: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/> [Consulta: 6 de septiembre del 2017].

RENDIMIENTO Y CALIDAD DE CHICOZAPOTE (MANILKARA ZAPOTA (L) P. ROYEN) MANEJADO CON CUBIERTA PLÁSTICA Y ARREGLOS ESPACIALES

Andrés Rebolledo Martínez¹, Evyzandra Palmyra Alemán Rebolledo², Rosa Laura Rebolledo García¹, Juan Valente Megchún García², María Enriqueta López Vázquez¹, Laureano Rebolledo Martínez¹ y Gerardo Montiel Vicencio¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, ²Universidad Veracruzana

RESUMEN

El chicozapote es un frutal tropical no tradicional poco explotado, considerado en América como exótico; es muy propagado en países asiáticos y se cultiva en 14 estados de México. El chicozapote Betawi, ha tenido mejor valor comercial, pero la falta tecnología para su cultivo justifica este estudio. El objetivo fue conocer el rendimiento y caracterización de los frutos establecidos a diferentes densidades de plantación con cubierta plástica y suelo desnudo. El chicozapote se estableció en el 2005, en el Campo Experimental Cotaxtla, en Veracruz; los árboles están establecidos a una densidad de 156, 312, 625, 1250 árboles ha⁻¹; las densidades de 625 y 1250 árboles ha⁻¹ se establecieron con y sin acolchado plástico. Los datos corresponden a la cosecha de 2017. El diseño experimental fue bloques al azar con cuatro repeticiones. Se midió rendimiento, diámetro polar, diámetro ecuatorial y peso de fruto, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable. La densidad de 625 árboles ha⁻¹ superó en un $\geq 13.82\%$ a la densidad de 1250 árboles ha⁻¹, 156 y 312 árboles ha⁻¹. En la densidad de 625 árboles ha⁻¹ los chicozapotes con acolchado plástico tuvieron un rendimiento de 12 t ha⁻¹ superior a los chicozapotes sin acolchado plástico. Los frutos de la densidad de 156 árboles ha⁻¹ pesaron 211 g. En las densidades de 156 y 312 árboles ha⁻¹ los frutos tuvieron un diámetro polar entre 9 y 8 cm, en el diámetro ecuatorial la media para los tratamientos fue de 6.6 cm. En la densidad de 312 árboles ha⁻¹ se obtuvo 5.25 ° Brix, superior al resto ($\alpha=0.922$), y en la acidez total titulable del fruto la media fue de 0.019 %. El mayor rendimiento de chicozapote fue en la densidad de 625 plantas ha⁻¹ y los chicozapotes con acolchado plástico tuvieron mejor rendimiento.

INTRODUCCIÓN

El chicozapote *Manilkara zapota* (L.) P. van Royen, es uno de los frutos tropicales más importantes de la familia sapotaceae; el árbol, de esta especie, se utiliza para la obtención de madera y de látex para la producción de chicle. Es originario del Sureste de México y Centro América, sin embargo, se cultiva en Tailandia, India, Estados Unidos, Filipinas, México y Venezuela, donde existen variedades y diferentes selecciones (Arévalo *et al.*, 2007). Además de consumirse en su zona de origen, es importado por países de todo el mundo como Canadá, Estados Unidos, Singapur, Qatar Arabia Saudita, Omán y Kuwait (Srivastava *et al.*, 2017); y la demanda del fruto va en aumento debido al incremento poblacional de los países consumidores, a la globalización y al sabor placentero y dulce de su pulpa (Balerdi *et al.*, 2008).

El cultivo del chicozapote se caracteriza por presentar una heterogeneidad del estado físico y fisiológico de las plantas, lo que ha promovido la generación y adaptación de técnicas de agronómicas para su manejo, considerando el efecto que tienen en la calidad del fruto. Actualmente entre los trabajos de investigación del área que se promueven está la reproducción de plántulas en viveros con hormonas y micorrizas (Parada *et al.*, 2001), arreglos espaciales y el uso de coberturas. Existen recomendaciones sobre el uso de acolchado en plantaciones de chicozapote como una técnica física para el control de malezas, retención de humedad, incremento de temperatura de suelo y promover el crecimiento, (Balerdi *et al.* 2008, Rebolledo *et al.*, 2011 y Srivastava *et al.* 2017), sin embargo, no se especifica el efecto de esta práctica en la calidad y rendimiento del fruto de chicozapote. Asimismo, existen recomendaciones sobre densidad de plantación, por un lado, Balerdi *et al.* (2008) promueven un arreglo espacial de 7.6 m entre árbol; Rebolledo *et al.* (2011) promueven un incremento en la densidad para una producción intensiva, Srivastava *et al.* (2017) el ajuste de densidad al paso del tiempo. Lo anterior indica que la información existente no es concluyente, por lo que el objetivo de este experimento fue evaluar el rendimiento del chicozapote en diferentes arreglos espaciales y con cubierta plástica, además conocer las características químicas y físicas del fruto de chicozapote.

PARTE EXPERIMENTAL

El experimento se estableció en las instalaciones del Campo Experimental Cotaxtla, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en el km 34.5 de la carretera Federal Veracruz-Córdoba municipio de Medellín, Veracruz, México; se localiza a 18° 16' Latitud norte y 96° 16' longitud oeste, a una altitud de 40 msnm.

El clima donde prosperan los árboles de chicozapote es Aw_0 que corresponde a un cálido subhúmedo con temperatura media del mes más frío mayor de 18 °C. La temperatura media anual es de 25.5 °C, con una máxima de 37 °C. La precipitación media anual es de 1,300 mm; el periodo de lluvias inicia en junio y termina en octubre.

El suelo es Vertisol, de textura migajón arcillosa con 30% de arcilla en todos los horizontes a una profundidad de un metro, oscuro con textura uniforme fina o muy fina, con un pH de 6.5, buen drenaje superficial y un contenido alto de materia orgánica.

El terreno experimental con árboles de chicozapote fue establecido en el 2005 con un arreglo espacial de 8 m x 8 m (156 plantas ha^{-1}), 8 m x 4 m (312 plantas ha^{-1}), 4 m x 4 m sin acolchado (650 plantas ha^{-1}), 4 m x 4 m con acolchado (650 plantas ha^{-1}) 4 m x 2 m con acolchado (1,250 plantas ha^{-1}) y 4 m x 2 m sin acolchado (1,250 plantas ha^{-1}). Los árboles de las dos densidades bajas se podaron anualmente dejando ramas laterales 2 m, por 3 m de altura.

Para la medición de las variables se consideró como unidad experimental un árbol y se tomaron cuatro repeticiones, a cada unidad se les contó el número de frutos. Se colectaron 10 frutos maduros de cada árbol seleccionado, como submuestra, para realizar las determinaciones de calidad de fruto. Las variables respuesta fueron: diámetro polar, diámetro ecuatorial, peso de fruto, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable y rendimiento.

Los diámetros polar y ecuatorial se tomaron con ayuda de un vernier. El peso de fruto fresco se tomó al colocar el fruto en una balanza digital, los datos se reportaron en gramos. La determinación de los SST se realizó con un refractómetro digital manual marca ATAGO, a cada fruto se le sacó una gota de jugo que se colocó sin diluir en el lector del refractómetro; los datos se están expresados en °Brix.

$$\% \text{ de acidez titulable} = \frac{(\text{mL NaOH gastados})(N \text{ NaOH})(\text{meq. del ác.})}{\text{Alícuota}} * 100$$

La acidez titulable de los frutos de chicozapote se tomaron con una muestra de 10 mL de jugo y se tituló con hidróxido de sodio al 0.1 N, hasta obtener un cambio de color, utilizando como indicador fenoftaleína. Con los datos obtenidos de hidróxido de sodio gastado, se calculó el porcentaje de acidez con la siguiente ecuación:

Considerando que Meq. del ác. corresponde a los miliequivalentes del ácido y la normalidad del hidróxido de sodio fue de 0.1.

Finalmente, para determinar el rendimiento de fruto por hectárea, primero se calculó el rendimiento por unidad experimental al promediar los pesos de los frutos muestra y multiplicarlo por el número de frutos en cada árbol. Posteriormente se obtuvo la media de cada tratamiento y se extrapolo en base a la densidad de plantación.

RESULTADOS

Se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0.98$) en el diámetro polar del fruto, sobresaliendo aquellos que provenían de árboles en densidades de 156 y 312 plantas ha^{-1} (Figura 1). El diámetro de algunas variedades de frutos de chicozapote se encuentra entre 5 cm y 6 cm lo cual concuerda datos obtenidos por Shirol, *et al.*, 2009 en un estudio de cultivares de chicozapote.

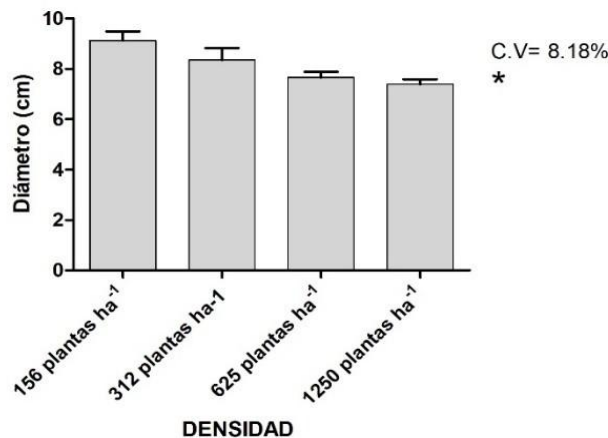


Figura 1. Diámetro polar de fruto de Chicozapote establecido en diferentes densidades de plantación. *, diferencia estadística significativa al 95% de probabilidad. Barras \pm error estándar. En el diámetro ecuatorial no se manifestó diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Figura 2). La media de diámetro ecuatorial fue de 6.6 cm.

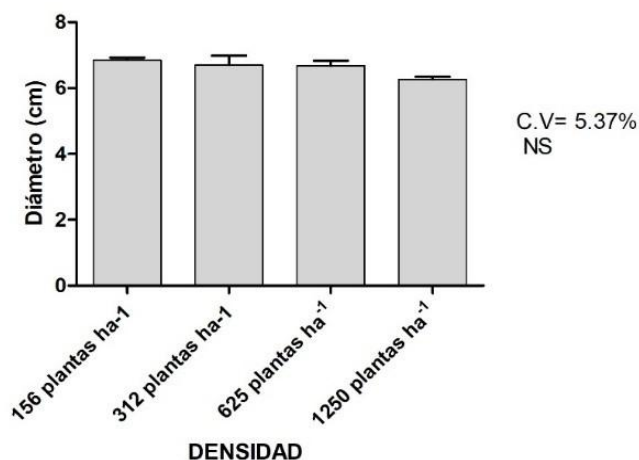


Figura 2. Diámetro ecuatorial de fruto de Chicozapote establecido en diferentes densidades de plantación. NS, diferencia estadística al 81%. Barras \pm error estándar.

En la variable del peso de los frutos de la densidad 156 plantas ha⁻¹ y 312 plantas ha⁻¹ fue mayor; 211 g y 202.79 g respectivamente a una probabilidad de 90% de acuerdo con el análisis de varianza (Figura 3), ver error estándar, lo cual relaciona el tamaño con la competencia entre densidades, hecho que se refuerza con el diámetro de fruto (Figura 1). Lo cual difiere con lo encontrado por Gazel (2002), quien realizó un trabajo de caracterización de plantas de chicozapote realizado registrando pesos de 102 g y concuerda con lo reportado por Balerdi *et al.* (2008) que clasifican el peso del material Betawi entre los 140-315 g

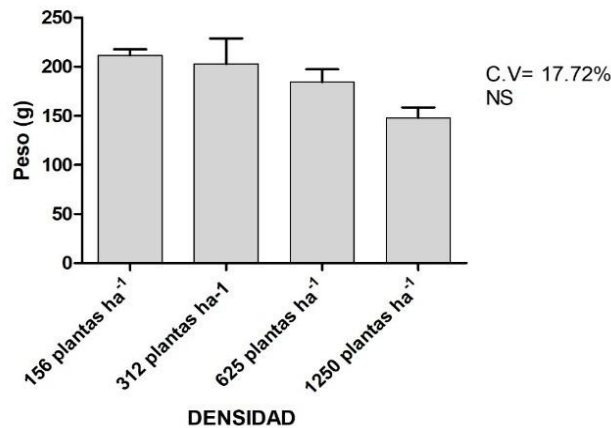


Figura 3. Peso de fruto de chicozapote establecido en diferentes densidades de plantación. NS, diferencia estadística significativa al 90%. Barras \pm error estándar.

La mayor cantidad de sólidos solubles totales se encontró en los frutos de los árboles establecidos a 312 plantas ha⁻¹ con 15.25 °Brix ($\alpha=0.922$) como se muestra en la Figura 4. Estos resultados son similares a los encontrados en chicozapote tipo fino, quienes reportaron valores de 21.4 a 15.8 °Brix en madurez de consumo; estos resultados durante el proceso de maduración es consecuencia de un proceso de inversión de sacarosa (Bautista, *et al.*, 2005), Vargas, *et al.*, (2015), coinciden también en estos resultados al reportar 14.22°brix en fruto. Con respecto al contenido de azúcares totales, los frutos almacenados durante 11 días a 21 \pm °C, presentan un ligero incremento en el contenido de azúcar totales de 13.07 % a 14.38% (Arévalo *et al.*, 2005). Si los frutos son almacenados durante 30 días mantenidas a temperaturas de 2 y 10 °C, la fruta continua su proceso de maduración e incrementa el contenido de solidos solubles totales, se puede encontrar valores entre 15 y 16°Brix (Vargas *et al.*, 2005). En otro estudio realizado en chicozapote los valores que se encontraron en chicozapote son de 19°brix (Vargas *et al.*, 2008).

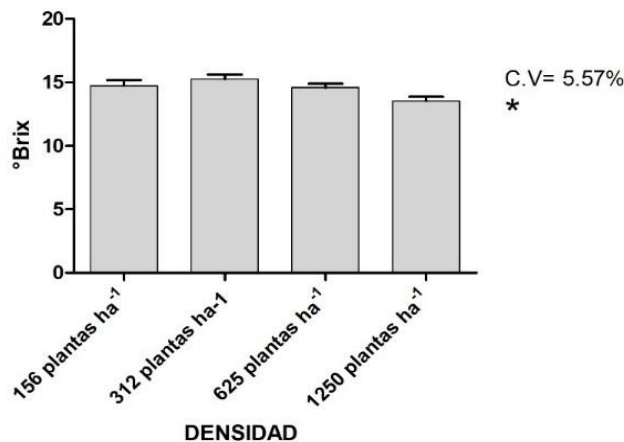


Figura 4. Sólidos solubles totales (°Brix) de fruto de Chicozapote establecido en diferentes densidades de plantación. NS, diferencia estadística al 92% de probabilidad. Barras \pm de error estándar.

Con respecto a la acidez total titulable (ATT), no se manifestó diferencia estadística significativa entre tratamientos. Se obtuvo un coeficiente de variación de 17.8% y una media de 0.019% de acidez total titulable, como se muestra en la Figura 5; coincidiendo con lo reportado por Vargas, *et al.*, 2015 en donde obtuvo un porcentaje de acidez de 0.017% lo cual está dentro del rango de lo obtenido en este trabajo. En otro estudio de chicozapote se encontraron valores de 0.13% de acidez, estos

valores son bajos comparado con lo encontrado en este estudio en las diferentes densidades (Vargas *et al.*, 2008).

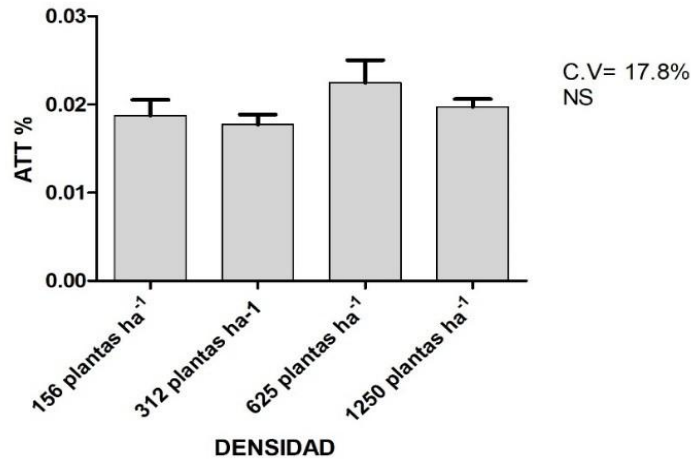


Figura 5. Acidez total titulable de fruto de chicozapote establecido en diferentes densidades de plantación. NS, diferencia estadística al 68% de probabilidad. Barras \pm error estándar.

En el rendimiento del chicozapote se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las diferentes densidades ($\alpha=0.958$) siendo la de 625 plantas ha⁻¹ y 1,250 plantas ha⁻¹ las de mayor producción superando estadísticamente a las otras densidades de plantación (Figura 6). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en el 2011 por Rebolledo, *et al.*, 2012 en este mismo experimento a los cuatro años de edad de la plantación, en los cuales el mayor rendimiento se obtuvo en las plantaciones de 625 plantas ha⁻¹ y 1,250 plantas ha⁻¹, aunque en esta ocasión la densidad de 625 plantas ha⁻¹ superó por 13.82% a la densidad de 1,250 plantas ha⁻¹. Además, con el uso de micorriza *Glomus mosseae* y ácido giberélico (AG₃), es posible incrementar la calidad en el crecimiento y desarrollo de las plantas de chicozapote como mayor área foliar y diámetro de tallo (Parada *et al.*, 2001). En el Cuadro 1, se presentan los tratamientos con el uso de cubierta plástica; se observa que la cubierta plástica mejoró el rendimiento; esto puede ser en razón de que el uso de acolchado plástico, mejora las condiciones de suelo donde se desarrolla las raíces del árbol (Rebolledo *et al.*, 2011).

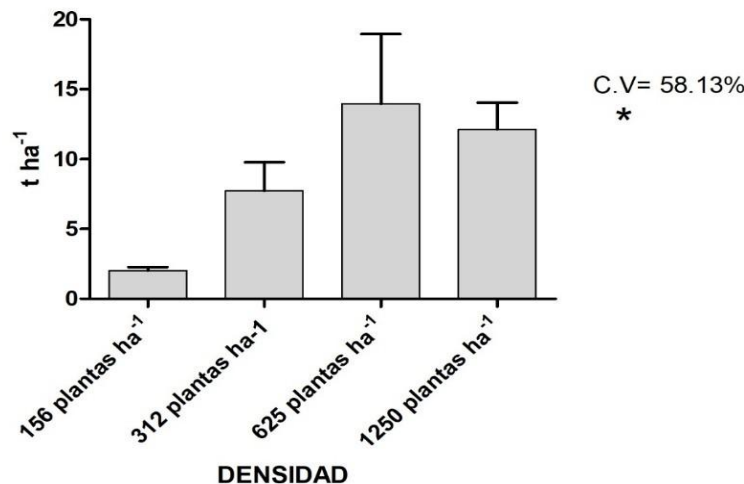


Figura 1. Rendimiento de chicozapote establecido en diferentes densidades de plantación. *, diferencia estadística significativa al 95% de probabilidad. Barras \pm error estándar.

Cuadro 1. Acolchado plástico con el manejo de densidades de plantación en chicozapote.

Tratamiento	Rendimiento (t ha ⁻¹)
1. Sin cubierta plástica (4 por 4 m)	5.5 b
2. Con cubierta plástica (4 por 4 m)	10.2 a
3. Sin cubierta plástica (4 por 2 m)	7.0 ab
4. Con cubierta plástica (4 por 2 m)	13.3 a
C.V. (%)	48.8

CONCLUSIONES

El uso de cubierta plástica en las densidades de plantación establecidas a 4 por 4 m y 4 por 2 m, incremento el rendimiento de los frutos de chicozapote. El mayor rendimiento fue en la densidad de 625 plantas por hectáreas. Los frutos que alcanzaron mayor peso fueron las que se establecieron en bajas densidades de 312 y 312 plantas por hectárea. Con respecto al contenido de azúcares, los frutos presentaron similares valores, pero el contenido de acidez más alto fue alcanzado en la densidad de 625 plantas por hectárea, alcanzaron valores más altos. Con el uso densidades altas es posible obtener altos rendimientos y frutos de calidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arévalo G., L., Bautista R., B., Saucedo V., C., Martínez D., T. "Almacenamiento refrigerado y aplicaciones de 1-Metilciclopropeno (1-MCP) en frutos de chicozapote (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen", *Agrociencia*, Vol. 41, 4, 2007, pp. 467-477.
2. Arévalo G., M. L., Bautista R., B., Saucedo V., C., Martínez D., Ma. T. "Proceso de maduración y almacenamiento en refrigeración de frutos de chicozapote (*Manilkara zapota* L. Van Royen) tipo fino", *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, Vol. 7, 1, 2005, pp. 7-13.
3. Balerdi, C. F., Crane, J. H. y Maguire, I. "Sapodilla Growing in the Florida Home Landscape". *Horticultural Sciences Department Document HS1*. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. (2008).
4. Bautista R., B., Arévalo G., M. de L., Saucedo V., C. y Martínez D., M. T. "Proceso de maduración de frutos de chicozapote *Manilkara zapota* (L) P. Royen tipo fino". *Revista Chapingo Serie Horticultura*. Vol. 11, 2, 2005, pp. 387-391.
5. Gazel F., A. B. "Caracterización de chicozapote (*Manilkara zapota* (L.) van Royen". *Revista Brasileña Fruticultura*. Vol. 24,3, 2002, pp. 727-730.
6. Parada B., F. A., Jaen C., D., Becerril R., A. E. y García P., E. "Desarrollo y calidad del portainjerto inoculado con *Glomus mosseae*, aspersion de AG3 y fertilización NPK al suelo y foliar", *Terra latinoamericana*, Vol. 9, 2, 2001, pp.133-139.
7. Rebolledo M., A., del Ángel P., A. L., Megchún G., J. V., Adame G., J., Nataren V., J. y Capetillo B., A. "Coberteras vivas para el manejo de malezas en mango (*Mangifera indica* L.). cv. Manila", *Tropical and subtropical Agroecosystems*, Vol. 13, 2011, pp. 327-338.
8. Rebolledo M., A., Del Angel P., A., Peralta A., N. "El chicozapote en México: usos y técnicas de cultivo" (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Medellín de Bravo, Ver, 2012). 195 p.
9. Shirol, A. M., Kanamadi, V. C., Shankargouda Patil y Thammaiah, N. "Studies on the performance of new sapota cultivars under Ghataprabha command area", *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 22, 5, 2009, pp. 1056-1057.
10. Srivastava, A.K., Poonam Kashyap, Vijay Singh Meena, Nisha Verma y S.P. Singh. "Sapota [*Manilkara achras* (Mill.) Fosberg (Syn: *Achras zapota* L.)]" in *Underutilized fruit crops: importance and cultivation* (JAYA Publishing House, Delhi, India, 2017), Chapter 53, pp. 1159-1194

11. Vargas V., M. L., Centurión Y., A., Tamayo C., J., Sauri D., E. "Efecto del almacenamiento a bajas temperaturas sobre la calidad del chicozapote (*Achras sapota*)", Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, Vol. 7, 1, 2005, pp. 14-23.
12. Vargas V., M. L., González N., S. A., Escamilla S., J. B. y Tamayo C., J. "Alternativa para la comercialización del chicozapote (*Achras sapota*) tecnología de los tratamientos mínimos", Revista Mexicana de Agronegocios, Vol. 23, 2008, pp. 644-656.
13. Vargas V., M. L., Sauri D., E., Tamayo C., J, González N., S. A. y Cortes J., T. "Chicozapote fresco y cortado (*Achras sapota*) con actividad antioxidante; una demanda actual del consumo de frutas", Revista Mexicana de Agronegocios, Vol. 36, 2015, pp. 1315-1324.

PERCEPCIÓN DEL SACRIFICIO DE ANIMALES (PAVOS) EN ALUMNOS DE INICIO DE LA LICENCIATURA EN PRODUCCIÓN ANIMAL.

Itzel Guadalupe Beltrán Serrano¹ Alfredo Trejo Córdova²,
María del Carmen Navarro Maldonado³, Demetrio Alonso Ambríz García⁴

¹Licenciatura de Producción Animal, ^{2,3,4}Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa¹ correo electrónico: deme@xanum.uam.mx

RESUMEN

La crianza de animales contempla las bases zootécnicas, con las cuales se alcanzará la mejor producción, nivel de bienestar animal y ganancias económicas. Recientemente ha avanzado la ideología social del no consumo de carnes, argumentando malos métodos de producción o sacrificio con sufrimiento animal. Al respecto una extensa normativa regula las mejores condiciones humanitarias de estos procesos. En licenciaturas afines a esta temática la opinión es controvertida. Con la finalidad de conocer la percepción del método de sacrificio de pavos con alumnos del inicio de la Licenciatura en Producción Animal en la UAM-Iztapalapa se realizó el presente trabajo. Los alumnos (n= 15) fueron preparados en la engorda y aprovechamiento de pavos. Se respetó sus formas personales de pensar y se les invitó a participar en el sacrificio para obtención de subproductos y carne para consumo. Al término de estas labores, se les aplicó una encuesta. Los resultados obtenidos indicaron que son conscientes (50%) de que el sacrificio es la manera de llegar a la transformación para obtención de carne. El 100% consideró la importancia de evitar sufrimiento animal en este proceso, aunque reconoce (73%) que la norma no se cumple o falta vigilancia y seguimiento de la autoridad. El 27% nunca antes había sacrificado un animal de abasto. El 60% refirió haber experimentado una sensación desagradable y un 79% declaró que el animal sufrió. A pesar de que el 100% reconoció que el método realizado fue eficaz y el 100% refirió que de ser necesario volvería a hacerlo. Se concluye que es necesario realizar estas prácticas con sensibilidad y coadyuvar a la difusión y cumplimiento de las normas y especialmente a las diversas opiniones controversiales de este proceso.

INTRODUCCIÓN

Existe, especialmente entre los jóvenes de nuestra sociedad actual, la sensación de que la producción animal solo es producto de maltrato y crueldad, queriendo incluso en algunos pasos del proceso productivo, mirarlo y compararlo con parámetros humanizados. Se recomienda constantemente el no consumir productos o subproductos de origen animal, porque, se dice, inevitablemente han sido obtenidos de manera cruenta, infringiendo sufrimiento a los animales, desde luego que estos argumento, con una marcada tendencia comercial hacia a donde quieren dirigir a los consumidores, por ejemplo el consumo de alimentos orgánicos, veganos o incluso sintéticos, donde dicho sea de paso, los costos de producción y de venta son más elevados y la calidad nutricional cuestionable.

Si bien la producción animal durante muchos años consideró al organismo como una “máquina” productiva, en época reciente han sido reiteradas las investigaciones y las llamadas de atención para priorizar el bienestar de los animales productivos por sobre los fines comerciales, ampliando estudios de etología, bienestar, y se han hecho grandes esfuerzos por el enriquecimiento ambiente y por proporcionar los mejores ambientes e insumos necesarios, procesos que aún no ha finalizado y que con frecuencia se siguen encontrando los aportes de mejora, para conciliar el interés de la producción animal con los pensamientos y sentimientos de los consumidores, es decir que ambas partes concilien y caminen por los mismos senderos en satisfacción a los productores y a los consumidores y desde luego que con el mejor trato posible hacia los animales (Villanueva y Aluja, 1998).

Por otro lado las escuelas de producción animal y zootecnia, han modificado su currícula, tal y como se modifican los aspectos sociales demandantes, por ejemplo, las zonas dedicadas a la producción animal intensiva con frecuencia son removidas hacia la periferia de los centros poblacionales o ciudades, que no toleran la presencia de esta producción en masa a nivel urbano, por la generación de inconvenientes tales como olores, vectores, sonidos y plagas que perturban la paz social.

Fig 1. En las ciudades se desconocen pormenores de los procesos de producción de alimentos



Esto es comprensible, pero a cambio las nuevas generaciones desconocen el origen de los productos y su falta de relación con estos organismos proveedores, ha llevado a considerar que los productos cárnico o lácticos proceden de un medio industrial, razón que sustenta la presencia de granjas didácticas o urbanas, que refuerzan este conocimiento, así como las pequeñas unidades de producción en el medio urbano, porque además producen una sensibilización hacia el entorno natural que con frecuencia el ciudadano olvida. Por ello se ha propuesto acercar al campo a la ciudad para compartir este conocimiento y también acercar la ciudad al campo, para compartir parte de los adelantos y comodidades que disfrutan los habitantes de ellas.

Con respecto a la forma de pensar, es importante porque así como es diversa la producción animal desde la crianza de animales para abasto, por ejemplo en huevo, carne o leche, así también hay negocios de venta de animales pie de cría o genéticamente selectos, donde el producto principal será la venta de reproductores y no necesariamente el sacrificio de los mismos, también existe en boga un mercado muy importante de venta de mascotas o de criaderos de fauna silvestre con fines turísticos o de repoblamiento y de las granjas didácticas, donde la transmisión del conocimiento es lo principal. En este curso, una alumna conforme conocíamos sistemas de producción animal en el campo, sorprendida comentaba que no imaginaba que existiera tanto detalle en el cuidado en aspectos de alojamiento, manejo y alimentación de los animales, dado que el conocimiento general adquirido por ella, solo le indicaba que en este campo de la producción animal, se abusaba de los organismos y se hacían reiteradamente cosas sin escrúpulos (Aluja, 2011).

Es importante considerar que diversos factores empezaron a propiciar una actitud moral hacia los animales debido a:

Cambios sociales, a través del tiempo ha cambiado la manera de pensar en relación a los derechos de los demás individuos.

Explotación industrial: dominado el confinamiento “masivo” de los animales de granja y de las condiciones deplorables de muchos de estos, así como la necesidad del buen trato.

Sensibilización hacia la naturaleza: se propaga el tener sentido de que no somos los únicos que vivimos en la tierra y que existen muchos más seres vivos como nosotros.

Impacto Ambiental: el costo al planeta que implica que no tratemos bien no solo a los animales sino a los demás organismos compromete nuestro propio futuro.

Bienestar Animal: defender los “derechos de los animales”.

Fig 2. Se ha mal orientado la producción animal según intereses tendenciosos.



Los alumnos ingresan en buena medida a las instituciones de educación superior, sin un sustento firme de experiencia relacionada con su vocación profesional, que si bien existe el antecedente familiar ligado al campo o a la producción animal, sirven también los medios de comunicación para acrecentarlo u orientarlo. Por ejemplo, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ha orientado su plan de estudios hacia la clínica de pequeñas especies, por la demanda que esto supone, recientemente la UAM Xochimilco también modificó su plan de estudios en ese mismo sentido, con una creciente demanda estudiantil para atender perros, gatos y otras mascotas en el medio urbano, reduciéndose la atención de los animales productivos de abasto. De ahí la necesidad de ir monitoreando a los alumnos de las nuevas generaciones en diferentes aspectos de la producción animal, uno de los cuales es el sacrificio de los animales para obtención de su productos y subproductos a manera de satisfactores para los consumidores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Crianza de pavos.

La UAM Iztapalapa cuenta con una pequeña granja didáctica donde los alumnos, con la asesoría de sus profesores tienen acceso a modelos de sistemas de producción animal. Con esta intención se tuvo al acceso una corraleta de 18m², acoplada a un área de pastoreo de 15m² donde los animales pueden salir durante el día para enriquecimiento ambiente. Se tuvieron 20 pavos raza Hybrid Gigante Línea 700, de 3 semanas de edad y peso promedio de 1kg, procedentes de la Granja Chihuahua, del fraccionamiento las Delicias en Atlautla, Estado de México, que venían con sus primeras vacunas. Fueron alimentados con balanceado comercial Malta (Pavo inicia) durante las primeras tres semanas de vida y posteriormente con pavo finaliza al 50% con maíz quebrado y forraje de plántula de maíz. Los alumnos, procedentes de una materia del segundo trimestre (de doce de duración de su Licenciatura en Producción Animal), fueron los responsables de esta producción, asistiendo cada día durante los 70 días que dura la engorda. Llevaron a cabo los registros de producción, sanitarios y evaluaron las ganancias de peso, índice de conversión y costos de producción. Al término de la engorda los alumnos adquirieron los animales finalizados al precio de costo de producción.

Fig 3. Sistema de Producción de Pavos llevado por los alumnos.



Sacrificio de los Pavos.

El sacrificio se realizó con otra parvada de producción urbana, que no criaron los alumnos, cuatro semanas antes de la finalización de la engorda de la parvada de ellos. Se realizó fuera de las instalaciones de la Universidad y donde existieron las facilidades para el procesamiento. Se realizó como una actividad adicional al curso, indicando que asistieran solo los que quisieran conocer la técnica de sacrificio. Se citaron en dos subgrupos por lo reducido de las instalaciones y se programó que unos fueran sacrificando y desplumando, en tanto otros limpiaban las canales, posteriormente se cambiarían las funciones. Esta parvada urbana fue de 7 animales, hembras y machos con peso promedio de 8 kg. Los machos hasta de 10 kg y las hembras hasta de 6.5 kg, y tuvieron una edad similar a la que tuvo la parvada de UAMI a finalización.

Inicialmente se procedió a la contención e inmovilización de los animales, posteriormente se procedió al aturdimiento y al degüello. Se calentó agua a 40°C y luego de inmersión se procedió al desplume comenzando por las alas y cola y posteriormente el cuello y el resto del cuerpo. Se pasaron al área de preparación de canales donde se lavó la canal cerrada, posteriormente por incisión en área media baja, sobre la cloaca, se extrajo la víscera verde (abdominal) y posteriormente roja (pulmones y corazón), se cortaron patas y cabeza y la canal se lavó con abundante agua y se dejó escurrir y reposar para que madurara la carne. Luego se empleó para proceder a la entrega de las mismas a los consumidores.

Fig 4. Sistema de Producción urbano donde se sacrificaron los pavos.



Encuestas.

Los alumnos que participaron en el sacrificio, no habían sido informados de que se recabaría información a través de encuestas escritas, para lo cual otra alumna diseñó y aplicó la encuesta a 30 minutos del término del sacrificio de los animales. Cada alumno aceptó llenar voluntariamente la encuesta, una vez que les fue explicado que la información sería utilizada para el presente trabajo. El instrumento contó con 11 reactivos de respuesta abierta, para la libre orientación de la respuesta.

Análisis Estadístico.

Las encuestas fueron vaciadas y las respuestas fueron agrupadas, obtenidas las medidas de tendencia central y porcentual, para conocer la percepción en este procedimiento en alumnos de inicio de la Licenciatura en Producción Animal.

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Los alumnos de primeros niveles de la Licenciatura en Producción Animal aceptaron voluntariamente participar en la actividad. Los resultados de la encuesta se presentan por cada uno de los reactivos formulados:

1.- ¿Qué es sacrificio animal? El 50% contestó que es una transformación, donde el animal será procesado para obtener algún beneficio de él (carne). 29% dijo que será un proceso donde se matará a un animal, debe hacerse sin dolor y respetando la ética y el 21% comentó que simplemente era la terminación de la vida de un animal.

2.- ¿Crees que cuidar el bienestar animal en este proceso es importante? El 100% respondió que sí es importante cuidar el bienestar animal y que entre menos alterado este el animal, mejor será la calidad del producto obtenido.

3.- ¿Consideras que en México se cumplen con las diferentes normas de bienestar animal así como las involucradas en el sacrificio animal? El 73% comentó que no se siguen ya que las normas son insuficientes y no están completamente reguladas y vigiladas. El 27% contestó que sí, para eso se hace cargo la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación).

4.- Menciona los diferentes tipos de rastros que conoces. El 73% no tiene conocimiento de los tipos de rastros existentes, el 27% solo conoce los TIF (Tipo Inspección Federal).

5.- ¿Consideras que sacrificar a un animal es maltrato? 100% considero que no siempre y cuando se cumpla con las normas correspondientes para satisfacer una cadena alimenticia.

6.- ¿Habías sacrificado a un animal anteriormente?

73% Dijeron que si lo habían hecho y 27% que era su vez primera.

7.- ¿Qué sentiste cuando realizabas el sacrificio?

34% Experimentaron nerviosismo por desear no causar dolor al animal durante el proceso, 27% Lo hicieron con decisión y firmes, dado que no era su vez primera, 13% no sintieron algo específico, 13% Miedo de hacerlo mal y 13% tristeza por el animal.

8.- ¿Crees que el animal sufrió dolor durante el proceso? 73% contestaron que Si, porque el animal presintió lo que se realizaría con él, aunque era momentáneo, el 20% que no porque inicialmente se hizo el aturdimiento y 7% no contesto.

9.- ¿Consideras que el método de sacrificio fue el adecuado?

El 100% respondió que si por ser eficaz y rápido.

10.- ¿Volverías a realizar el sacrificio?

EL 100% comento que sí, de los cuales 34% Lo haría porque es algo natural y parte de la cadena alimenticia, el 26% que porque era algo indispensable por ser alumno de esta licenciatura, el 20% por ser algo normal y el 20% por aprendizaje y dominio.

11.- Opinión de las personas que trabajan en rastro o realizan el sacrificio animal constantemente.

60% comentó que es un trabajo común a desarrollar, 28% que tendría una gran responsabilidad en sus manos, el 6% deben tener un amplio criterio y fortaleza moral y el 6% que con el tiempo esas personas se deshumanizan.

En resumen podemos mencionar que la percepción de los alumnos que inician la Licenciatura en Producción Animal indica que son conscientes (50%) de que el sacrificio es la manera de llegar a la transformación para obtención de carne. El 100% consideró la importancia de evitar sufrimiento animal en este proceso, aunque reconoce (73%) que la norma no se cumple o que falta vigilancia y seguimiento de la autoridad. El 27% nunca antes había sacrificado un animal de abasto. El 60%

refirió haber experimentado una sensación desagradable y un 79% declaró que el animal sufrió. A pesar de que el 100% reconoció que el método realizado fue eficaz y el 100% refirió que de ser necesario volvería a hacerlo.

Es muy importante señalar que el aturdimiento de los animales previo al sacrificio, es una práctica obligatoria y deseable para evitar sufrimiento, en la actualidad se prefiere a nivel industrial el aturdimiento gaseoso por CO² que presenta mejora en la calidad final de las canales (ausencia de huesos rotos, disminución de hematomas y petequias) Los rasgos de calidad que resultan importantes para una carne fresca de pavo son el color, la textura, la capacidad de retención de agua y la ausencia de sangre residual. Para ello, se evalúan indicadores de calidad de la carne fresca como el pH, el color, las pérdidas de agua por goteo, las pérdidas por cocinado, la textura, la presencia de sangre residual y la composición fisicoquímica (López, 2017)

CONCLUSIONES

El sacrificio animal es un tema tabú y controversial, para el cual las personas que estén involucradas deben de hacerlo con gran atención en evitar el dolor y sufrimiento del animal y porque en ese momento, se termina el proceso de la producción animal y comienza el aprovechamiento, para lo cual la calidad del producto debe ser máxima

Aunque el sacrificio es un problema ético importante, no es asunto del bienestar animal. Los problemas morales del bienestar animal se relacionan con lo que ocurre antes de la muerte, incluyendo el trato que se les da a los individuos durante la última parte de su vida, seguido por el período previo al sacrificio, y finalmente el método de sacrificio (Broom, 2011).

Los alumnos que inician la Licenciatura en Producción Animal si bien muestran aceptación por el sacrificio de los animales hacen un llamado al aspecto ético personal para proporcionar las mejores condiciones posibles a los animales en todo momento así como que los involucrados en esta labor profesional conozca y respetan las normatividad y que las autoridades respectivas apoyen en esta tarea al difundir el conocimiento, orientar, dar las facilidades para ejercerlas y en su caso las sanciones conducentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. V. Villanueva y A. Aluja. 1998. Estado actual de algunas plantas de sacrificio de animales para consumo en México. *Veterinaria México*. 29(3):273-8
2. M. López. 2017. Efecto del sistema de aturdimiento con CO₂ tiempo de desangrado y estimulación eléctrica post mortem en la calidad de carne de pavo. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Argentina pp 241.
3. A. Aluja. 2011. Bienestar animal en la enseñanza de la Medicina Veterinaria ¿Para qué porqué?. *Veterinaria México*. 42(2):137-147.
4. D. Broom. 2011. Bienestar animal: conceptos, métodos e indicadores. *Revista Colombiana de ciencias Pecuarias*. 24(6): 306-321.

DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A (OTA) EN MUESTRAS DE MAÍZ Y SUS DERIVADOS

Adriana Palacios Morales, Wilmer Castillo Najar, Virginia A. Robinson Fuentes

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

RESUMEN

En México el maíz es uno de los productos de consumo más importantes y éste está expuesto a contaminación por sustancias tóxicas producto del metabolismo secundario de hongos filamentosos. La OTA una micotoxina oncogénica, mutagénica, inmunotóxicas, neurotóxica y teratogénica, ésta se encuentra de manera natural en el maíz y otros productos de amplio consumo humano y alimentos para animales, esta toxina es producida por hongos de los géneros *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*. En nuestro país existen muy pocos trabajos acerca del contenido de OTA presentes en los alimentos y no existe alguna legislación que regule la concentración de ésta en dichos productos para asegurar la inocuidad de los mismos. El objetivo de este trabajo fue analizar el contenido de Ocratoxina A en granos de maíz provenientes de diferentes municipios del estado de Michoacán. Se obtuvieron 43 muestras de maíz provenientes de Morelia, Querendaro, Ciudad Hidalgo, Tacámbaro e Indaparapeo. La extracción de la OTA para cada muestra de maíz y la prueba inmunoenzimática se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit marca Helica® BIOSYSTEMS INC. (Cat. No. 941OCH01M-96). Se encontró presencia de OTA en las 43 muestras de maíz analizadas, pero únicamente 4 muestras rebasaron los límites permitidos de 5 ng/g establecidos por la Unión Europea, de las 5 regiones el promedio general fue de 1.211 ng/g, el municipio con la concentración promedio más elevada fue la de Querendaro con 17.527 ng/g (3.124 ± 5.477), mientras que la muestra con niveles más bajos fue la de Ciudad Hidalgo con 0.081 ng/g (0.05 ± 0.024), la ciudad de Morelia presentó un promedio de concentración de OTA de 1.695 ng/g (0.282 ± 0.501). Aun cuando todas las muestras analizadas contenían OTA, únicamente 4 rebasaron los límites establecidos por la Unión Europea, lo cual indica el buen estado del maíz de las regiones analizadas; sin embargo, debe haber un monitoreo de los niveles de OTA en éste y otros alimentos en los que comúnmente se encuentra. Es necesaria una legislación en México para tener un monitoreo y así asegurar la inocuidad de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

La Ocratoxina A (también llamada OTA por sus siglas), fue descubierta en 1965 como metabolito secundario en *Aspergillus ochraceus* en muestras de maíz africano, fue asociada con la nefropatía endémica de los Balcanes y desarrollo de tumores en el tracto urinario. La OTA es una micotoxina producida por los géneros *Aspergillus sp* y *Penicillium sp* y se le considera neurotóxica, inmunosupresora, carcinogénica, teratogénica y genotóxica; contamina productos de consumo alimenticio como los cereales (maíz, trigo, cebada, etc.), bebidas alcohólicas (vino y cerveza), productos de molienda (café, maíz y cacao), carne, frutas (uvas) y algunos frutos secos (higo y pasas). La estructura molecular consta de un anillo de 2-4-dihidro-metil-isocumarina unido a un grupo carboxilo mediante un enlace tipo amida a una molécula de fenilalanina (Fig.1). Está molécula es termoestable, resiste temperaturas desde -4°C hasta 200°C , es poco soluble en agua y soluble en disolventes orgánicos polares, tiene características ácido débil y al ser excitada con luz ultravioleta emite fluorescencia.

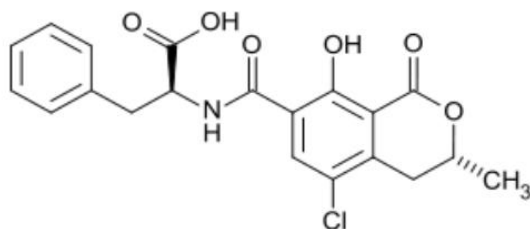


Figura 1. Estructura química de la Ocratoxina A (OTA)

La OTA se absorbe en el trato gastrointestinal y pasa a la circulación sistémica por lo cual se puede detectar en sangre y tejidos. Tiene una alta capacidad de fijación a las proteínas plasmáticas y su semivida de eliminación es larga, tanto la OTA como sus metabolitos se excretan por vía renal, hepatobiliar y en secreciones lácteas.

El mecanismo por el cual la OTA ejerce su toxicidad es la alteración sobre la respiración celular obteniendo radicales hidroxilados por peroxidación lipídica, formando aductos en el ADN que al intentar ser reparado puede caer en una mutación genética. También ésta produce alteración en la síntesis de proteínas; estudios han demostrado que tiene un efecto inductor sobre la caspasa y la proteína quinasa, lo que induce a una alteración de la síntesis de ADN.

Los niveles de OTA en estos productos están estrechamente relacionados con las condiciones de producción y conservación de los mismos; es decir, la práctica agrícola y las condiciones medioambientales como exposición a la humedad y temperatura. La práctica de nixtamalización a una temperatura, tiempo de exposición adecuada y tratamiento alcalino, reduce, aunque no en un 100%, las concentraciones de OTA en los productos de valor alimenticio en donde se puede encontrar dicha micotoxina. Por otro lado, un almacenamiento ideal, con una buena ventilación a una temperatura por debajo de los 18°C, con poca actividad de agua para evitar la humedad, reduce la concentración de OTA en los alimentos almacenados, ya que bajo estas condiciones el hongo no se puede desarrollar.

Nuestro principal planteamiento del problema se basa en el consumo de productos con alta probabilidad de tener concentraciones de OTA y que pueden ser elevadas o no, de acuerdo a la inocuidad con el que se lleva a cabo todo el proceso de su manufactura. Los cereales son la principal fuente de ingesta de OTA al organismo ya que son fundamentales en la dieta, tanto de animales como de humanos y se estima que aproximadamente el 50% de la ingesta diaria de OTA proviene de éstos. En México el maíz es uno de los alimentos de mayor consumo, parte fundamental de la dieta de los mexicanos, es fundamental dentro de las costumbres y tradiciones del país, además de su importancia económica como uno de los principales productos de exportación del país.

Actualmente en México no existen normas que regulen el límite de consumo permitido de OTA en alimentos, sin embargo se puede encontrar la NOM- 188-SSA1-2002, la cual se encarga de regular la cantidad de aflatoxinas en cereales para consumo humano y de animales, mas no se hace mención alguna a otras micotoxinas, como la OTA. Tampoco existen gran cantidad de trabajos de investigación acerca del contenido de OTA en alimentos mexicanos. La falta de información que se les proporciona a los consumidores acerca del producto que contenga dicha micotoxina.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de Ocratoxina A (OTA) en muestras de maíz de diferentes regiones del Estado de Michoacán que amplíen el registro del contenido de OTA en alimentos comercializados en el estado.

PARTE EXPERIMENTAL

Se recolectaron 43 muestras de maíz de distintas regiones del Estado de Michoacán, así como de Morelia, consistentes en 30 g. Cada muestra se trituró y se utilizaron 20 g de ese triturado, mismos que se mezclaron con 100 mL de solvente de extracción (metanol al 70% en agua destilada) con ayuda de un agitador magnético durante 5 minutos; posteriormente, se transfirieron 10 mL a un tubo para centrifuga de 15 mL y se llevaron a centrifugar durante 5 minutos a 3,500 G; después se tomó, con una alícuota, 1.5 mL de la muestra ya centrifugada para colocarlo en un microtubo. Una vez recolectadas todas las extracciones, se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su siguiente uso para la prueba de E.L.I.S.A. invertido, la cual fue llevada a cabo en el Centro de Estudios Multidisciplinarios en Biotecnología (CEMB), de acuerdo con las instrucciones del KIT marca Helica® BIOSYSTEMS INC., (Cat. No. 9410CH01M-96), para su realización se sacaron los extractos del congelador y se dejaron reposar hasta que alcanzaran temperatura ambiente. Se siguieron las instrucciones del fabricante, que son las siguientes: Se colocaron 200 µL del conjugado en cada pocillo de mezcla y se añadieron 100 µL de cada una de las soluciones estándar de Ocratoxina A del mismo Kit y de las muestras que se analizaron; se mezcló el contenido de cada uno de los pocillos con una micropipeta tres veces y se transfirieron 100 µL de cada una de éstas a su correspondiente pocillo recubierto con el anticuerpo. Se mezcló y se dejó incubar durante 15 minutos; después de este tiempo, se desecharon las soluciones y se lavaron 5 veces los pocillos con un buffer Tween-PBS. Se dejaron secar los pocillos sobre una servilleta absorbente colocados boca abajo.

Posteriormente, se adicionaron 100 μL de sustrato a cada pocillo y se incubaron protegidos de la luz durante 5 minutos. Finalmente, se adicionaron 100 μL de la solución de paro a cada pocillo y se midió la absorbancia de cada uno a 450 nm en el lector de E.L.I.S.A. Se determinó la concentración de cada muestra utilizando la curva de calibración construida con las soluciones estándar de Ocratoxina A.

RESULTADOS

Se encontró presencia de OTA en el 100% de las muestras de maíz analizadas, el promedio general encontrado en este estudio fue de $1.21 \pm 3.30 \text{ ng/g}$, con intervalos de concentración de 0.001 ng/g – 17.52 ng/g . En la tabla 1 se muestra la información del contenido de OTA por municipio.

Municipio	n	Promedio (ng/g)	Intervalo de concentración (ng/g)
<i>Ciudad Hidalgo</i>	6	0.04 ± 0.024	0.011 - 0.081
<i>Morelia</i>	10	0.282 ± 0.501	0.06 - 1.695
<i>Indaparapeo</i>	10	0.804 ± 1.694	0.048 - 5.540
<i>Querendaro</i>	13	3.124 ± 5.47	0.072 - 17.527
<i>Tacámbaro</i>	4	0.087 ± 0.076	0.021 - 0.191

Tabla 1.- Contenido de OTA de muestras analizadas por municipio

El municipio de Querendaro ($3.124 \text{ ng/g} \pm 5.47 \text{ ng/g}$) presenta el contenido promedio de OTA mas alto, mientras que el municipio con menor contenido de OTA fue Ciudad Hidalgo ($0.04 \text{ ng/g} \pm 0.024 \text{ ng/g}$). La ciudad de Morelia presentó un promedio de concentración de OTA de 0.282 ± 0.501 . Únicamente 4 de las 43 muestras analizadas superaron los límites establecidos por la Unión Europea de 5 ng/g . En la figura 2 se muestra una gráfica con los niveles de concentración por muestra indicando el límite permitido por las normas oficiales en la cual podemos observar que las muestras con más alto contenido pertenecen a Indaparapeo (IN1) y Querendaro (Q6, Q10 y Q12)

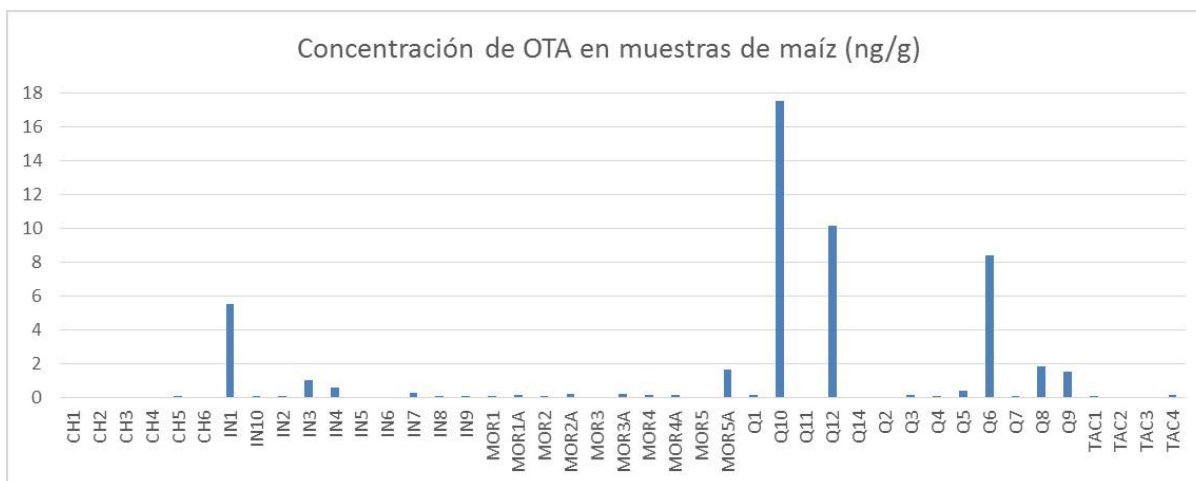


Figura 2. Concentración de OTA en muestras de maíz

En cuanto al análisis del contenido de OTA por el color o tipo de maíz, de la región de Ciudad Hidalgo se obtuvo maíz blanco tortillero, de Indaparapeo fue blanco y morado pozolero, de Querendaro se obtuvo maíz blanco tortillero, de Tacámbaro fue morado tortillero y de Morelia fue blanco tortillero y blanco cacahuazintle.

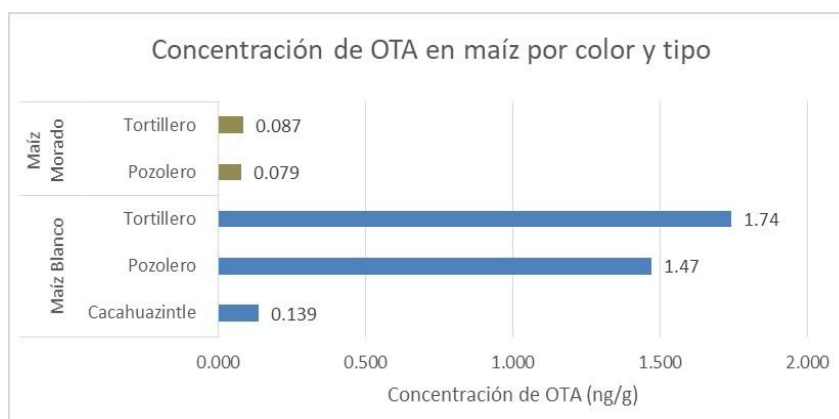


Figura 3. Concentración de OTA en maíz por color y tipo.

De manera general el maíz blanco presenta un mayor contenido promedio de OTA que el maíz morado siendo el maíz blanco tortillero el que presenta el mayor contenido promedio (1.74ng/g), seguido del maíz blanco pozolero (1.47ng/g), el maíz blanco cacahuazintle por el contrario presenta el contenido más bajo de OTA de los maíces blancos con 0.0139ng/g. el maíz morado, tanto el tortillero como el pozolero presentan concentraciones menores a las muestras de color blanco (0.087ng/g y 0.79ng/g, respectivamente).

En la tabla 2 se pueden observar más detalladamente los niveles de concentración de OTA desglosados por color y tipo de maíz de cada uno de los municipios de donde se recolectó el maíz de esta manera podemos observar que el maíz blanco tortillero es el que mayor contenido de OTA presenta.

Tabla 2. Contenido de OTA en los tipos de maíz de cada municipio.

Municipio	Color	Tipo	Concentración (ng/g)	D.S (ng/g)	Intervalos (ng/g)
<i>Ciudad hidalgo</i>	Maiz blanco	Tortillero	0.041	0.024	0.12 - 0.82
<i>Indaparapeo</i>	Maiz blanco	Pozolero	1.479	2.305	0.05 - 5.54
	Maíz morado	Pozolero	0.131	0.095	0.048 - 0.294
<i>Morelia</i>	Maiz blanco	Tortillero	0.491	0.674	0.142-1.69
		Cacahuazintle	0.074	0.063	0.001- 0.165
<i>Queréndaro</i>	Maiz blanco	Tortillero	3.125	5.477	0.001-17.52
<i>Tacámbaro</i>	Maíz morado	Tortillero	0.087	0.077	0.022- 0.191

CONCLUSIONES

De las 43 muestras analizadas el 100% presentó niveles de Ocratoxina A (OTA), esto quiere decir que todos los granos de maíz de las distintas regiones del Estado de Michoacán tienen contaminación causada por esa micotoxina.

Únicamente 4 muestras rebasan los límites permitidos por la Unión Europea de 5 ng/g, esto indica que el maíz analizado de Morelia y sus alrededores se encuentra en buen estado y que se cumple una buena práctica agrícola, por lo que su almacenamiento es el ideal para reducir el crecimiento del hongo productor de OTA.

Es necesario darle continuidad al monitoreo del contenido de OTA en éste y otros productos de consumo alimenticio y que tengan valor alimentario dentro de nuestro país, así como la creación de una legislación que establezca límites tolerables permitidos de OTA en alimentos de producto comercial para asegurar la inocuidad de los mismos.

Debido al gran consumo de cereales y otros alimentos expuestos a esta micotoxina es de suma importancia que se abra más campo de investigación sobre la Ocratoxina A (OTA), pues al contar con investigación e información fundamental e importante tanto para los científicos, consumidores y los productores se podrán crear regulaciones nacionales en dónde se proyecten y den a conocer los efectos nocivos que genera la OTA sobre el cuerpo humano y animal por el consumo excesivo y prolongado de esta micotoxina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bellver Soto, M. (2013). Evaluación del riesgo de exposición a Ocratoxina A. Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias. Universidad de Valencia. Burjassot. España.
2. Castillo, N., W. (2016). DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A EN CAFÉ, CERVEZA Y MAÍZ DE MORELIA MICHOACÁN POR UN METODO E.L.I.S.A. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México
3. Ravelo Abreu, A., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A. J., & de la Torre, A. H. (2011). La Ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6).
4. Robledo, M., De I, Marín, S. y Ramos, A. J. (2001). Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología*. 18:141-144.

CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LOS PEZONES EN VACAS HOLSTEIN EN LA POBLACIÓN DE TÉJARO MICHOACÁN

Carlos Bedolla Cedeño*¹, Rodolfo Lucio Domínguez¹, Ángel Raúl Cruz Hernández¹, José Carlos Bedolla García¹, Hugo Castañeda Vázquez², Martha Castañeda Vázquez², Valente Velázquez Ordoñez³, Benjamín Valladares Carranza³, Eduardo González Valdez⁴ *Email: bedollajl@yahoo.com.mx

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ²Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. ⁴Escuela de Químico-Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar en vacas Holstein-Friesian, las características morfométricas de los pezones, las cuales pueden ser importantes, en la producción de leche y a la resistencia individual a infecciones intramamarias como es la mastitis bovina. Se estudiaron las características morfométricas de 158 vacas Holstein-Friesian, de 22 hatos lecheros en la comunidad de Téjaro Michoacán, las cuales son explotadas bajo un sistema de producción semintensivo a pequeña escala. La evaluación se hizo siguiendo un esquema subjetivo que describió tres diferentes formas de los pezones: embudo, cilíndrico y botella, y cuatro categorías para la forma de la punta de los pezones: redondeada, puntiaguda, plana y prolapsada. Los pezones delanteros y traseros, derechos e izquierdos, fueron observados de manera separada, antes del ordeño vespertino. El largo del pezón se midió desde la base del mismo, donde se une a la ubre, hasta la punta. El diámetro del pezón se midió en la parte más amplia. La frecuencia de la forma del pezón fue: 43.83% cilíndrico, 32.91% embudo, 22.63% botella y 0.63% ciegos. La frecuencia de las formas fue: redondeada 54.91%, plana 24.05%, puntiaguda 18.83% y prolapsada 1.58%. Se concluye que la forma del pezón que tuvo mayor frecuencia de aparición en vacas Holstein-Friesian de la población en estudio fue el pezón cilíndrico, seguido de las formas embudo y botella, mientras que la forma de punta del pezón de mayor frecuencia fue la redondeada, seguida de las formas plana, puntiaguda, y prolapsada.

INTRODUCCIÓN

Las vacas tienen el sistema mamario más simple de todos los animales domésticos, la ubre de la vaca consiste en cuatro glándulas independientes, las mitades derecha e izquierda son claramente separadas por un ligamento medio, mientras que entre los cuartos anteriores y posteriores no existe demarcación clara, sólo son separados por un septum muy delgado de tejido conectivo (Foley *et al.*, 1972). El sistema de conducción de leche consta de una abertura dentro del seno del pezón, más arriba se comunica con el seno de la glándula, donde está conectado a un gran número de túbulos mamaros provenientes del tejido secretor. Sin embargo, estos animales, aun presentando un sistema mamario muy sencillo, son los más susceptibles a sufrir mastitis bovina, que es reconocida como una enfermedad que mayor pérdida económica causa en los establos lecheros (Rogers *et al.*, 1991). A pesar del avance científico en la materia y de los esfuerzos que se realizan con la aplicación de medidas de control, tratamientos con antibióticos y nuevos procedimientos de ordeño, esta patología es la razón principal de la eliminación de vacas en las unidades de producción lecheras. La morfología de la ubre y de los pezones, intervienen de manera importante en la capacidad de producción de leche y en la aparición de mastitis en vacas lecheras (Akhtar y Thakuria, 1999; Lund et al., 1999; Slettbakk et al., 1995).

Las diferencias anatómicas en las estructuras del pezón, especialmente la punta y el canal son asociadas con susceptibilidad a infecciones y reconocidas como parte del mecanismo de defensa pasiva contra la invasión de microorganismos porque impiden la entrada de estos a la ubre. El tamaño, la forma del pezón y la morfología externa del canal de la teta se deben evaluar clínicamente, porque son considerados como factores de resistencia individual en la patogénesis de la mastitis bovina (Appleman et al., 1972). Las características morfológicas del pezón y de la ubre, por ser de moderada a alta heredabilidad son criterios importantes en la evaluación y selección de bovinos

lecheros para mejorar la producción de leche y tener bajos niveles de presencia en mastitis (Miller *et al.*, 1992).

El mejoramiento genético de la salud de la ubre a través del tiempo ha sido moderado en Europa y casi inexistente en los Estados Unidos, no obstante, cada día en ese país se incrementa la selección de vacas lecheras tomando en cuenta la salud de la glándula mamaria. Países como Noruega y Suiza, si ponen considerable atención en la selección por resistencia a la mastitis.

En México se desconoce la existencia de datos que correlacionen las características morfológicas de la glándula mamaria con la producción y salud de la misma. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar en vacas Holstein, las características morfológicas de los pezones, las cuales pueden ser importantes, en la producción de leche y la resistencia individual a infecciones intramamarias como es la mastitis bovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluó un total de 158 vacas de la raza Holstein y el estudio fue realizado de septiembre a diciembre del 2017, en 22 establos lecheros ubicados en la comunidad de Téjaro, Michoacán. Las vacas al momento de ingresar a la sala de ordeño y previo al mismo, fueron observadas, para realizar la evaluación morfológica. Los pezones para su evaluación, se dividieron de acuerdo a su ubicación anatómica en la glándula mamaria: delantero derecho, (DD) delantero izquierdo, (DI) trasero derecho, (TD) trasero izquierdo (TI). Las puntas de los pezones también se dividieron de acuerdo a su ubicación anatómica en: punta delantera derecha (PDD), punta delantera izquierda (PDI), punta trasera derecha (PTD) y punta trasera izquierda (PTI). La forma del pezón se evaluó, de acuerdo con la clasificación de (Hickman, 1963) en tres tipos de pezones: Embudo (E), Cilíndrico (C) y Botella (B). En la forma de la punta del pezón se tomó la clasificación hecha por (Chrystal *et al.*, 1999) en: Redondeada (R), Puntaguda (PU), Plano (PL), Prolapsada (PR) e Invertida. El largo del pezón (LP) se midió desde la base de la ubre a la punta de la teta. El diámetro del pezón (DP) se midió con un vernier en la parte más amplia del pezón antes del ordeño.

Las vacas de la mayoría de los establos lecheros estudiados eran ordeñadas dos veces al día de manera manual y mecánica, pocos productores implementaban lo que es el sellador después del ordeño.

Los datos obtenidos se vaciaron en un registro diseñado para el trabajo de campo, y llevados a la base datos de Excel para su posterior análisis. Los análisis estadísticos se realizaron con la utilización de EXCEL versión 2010. Para la estimación de las diferentes formas de los pezones y puntas de los mismos, así como para la caracterización de las dimensiones, de diámetro y largo se utilizó de igual forma el programa de Excel, obteniéndose las diferentes distribuciones de frecuencias, promedios, porcentajes, etc. para estas características, las cuales, son reportadas en tablas e histogramas de frecuencia.

RESULTADOS

Forma del Pezón

De las 158 vacas evaluadas para caracterizar la forma del pezón se observó que las formas más frecuentes fueron: cilíndrico 277 (43.83%), embudo 208 (32.91%), botella, 143 (22.63%) y 4 (0.63%), ciegos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencia de la forma del pezón

Forma	Frecuencia	%
Embudo	208	32.91
Cilíndrico	277	43.83
Botella	143	22.63
Ciego	4	0.63

Fuente: Investigación directa.

Forma de la punta de los pezones

Las observaciones para la forma de la punta se hicieron de acuerdo con la ubicación anatómica de los pezones en la ubre, encontrándose los siguientes resultados: 347(54.91%) redondeada, 152 (24.05%) plana, 119 (18.83%) puntiaguda, 10 (1.58) prolapsadas, 4 (0.63%) ciegos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia de la punta del pezón

Forma	Frecuencia	%
Redonda	347	54.91
Puntiaguda	119	18.83
Plana	152	24.05
Prolapsada	10	1.58
Ciegos	4	0.63

Fuente: Investigación directa.

Diámetro de los pezones

Esta medida también fue realizada en las 158 vacas, las medidas que obtuvimos fueron de 1 a 4cm de diámetro, con medidas mínimas de 1-1.5 cm, siguiendo 1.6-2 cm, siguiendo 2.1-2,5cm, siguiendo 2,6-3cm, siguiendo 3.1-3cm, siguiendo 3,1-3.5 cm, y la máxima fue de 3.6-4cm.

Largo de los pezones

El largo de los pezones se midió desde la base de la ubre hasta la punta de los mismos, observándose un pezón con un largo mínimo de 2cm y un pezón con un largo máximo de 11.3 cm. El promedio del largo del pezón es de general es 5.48 cm. El largo del pezón que tuvo mayor frecuencia fue de 4.1-5 cm con un total de 204 pezones y el de menor frecuencia fue de 11.3 con solo un pezón.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron comparados con otras investigaciones similares a ésta, realizadas en vacas de raza Carola (Riera *et al.*, 2005) en donde se hace una comparación cada una de las características morfométricas registradas en esa investigación y las encontradas en las 158 vacas Holstein de la población de Tájaro, Michoacán. Respecto a la forma del pezón fueron ubicadas tres formas, que consistieron en la forma cilíndrica, botella y embudo, resultando ser más abundante la forma cilíndrica 277 (43.83%), embudo 208 (32.91%) y botella 143 (22.63%), además de la presencia de pezones ciegos 4 (0.63%), que a comparación con la otra investigación Riera *et al.*, 2015 se muestra que la forma de pezón más abundante lo fue la forma de embudo (48.93%), cilíndrico (33.65%), botella (14.80%) y perdidos (2.63%), sin embargo en otra investigación más (Hickman, 1963), quien realizara la misma investigación en vacas Holstein reporto 74.31% pezones cilíndrico, 24.73% en embudo y 1.94% en botella, datos similares a esta presente investigación.

Hickman (1963), también detecto que, en pezones con forma de embudo, la frecuencia de mastitis clínica u subclínica era más baja que en pezones cilíndricos y botella, lo que sería una característica desfavorable en las vacas Holstein, debido a que la frecuencia de aparición de los pezones cilíndricos es mayor que los pezones de embudo. Haciendo referencia a la investigación realizada por (Riera *et al.*, 2005), se menciona que la forma de embudo en los pezones de la vaca Carola, es el ideal para una mayor producción de leche y una baja susceptibilidad en contraer mastitis, a diferencia de la forma cilíndrica y de botella, sin embargo en esta investigación realizada en vacas Holstein no se encontró una diferencia significativa entre los pezones de forma de embudo y cilíndrico con respecto a la afirmación de estos autores, ya que la producción de leche no solo depende de la morfología de la ubre y los pezones, sino también de la alimentación que recibe el animal.

En cuanto a la susceptibilidad a contraer mastitis no se debe específicamente a la forma que tengan los pezones, también hay varios factores más como el manejo que se le da a los pezones después del ordeño con la implementación del sellado que impide la entrada de agentes bacterianos al interior del canal del pezón mientras se cierra el esfínter, lo cual dura aproximadamente dos horas después

del ordeño según (Echeverry, 2005), además la higiene de los establos, también puede presentar un foco rojo en la aparición de mastitis, cuando las vacas descansan en su propio excremento, agregando que los pezones entran en contacto directo con estos desechos y más aún si no fueron debidamente sellados después del ordeño. Según (Bassalik, 1978), una mayor incidencia de mastitis en pezones cilíndricos, podría deberse a que este tipo de pezones cierra el flujo de leche y se incrementa el vacío de succión que lesiona el pezón, lo que pudiese ser la causa directa en mastitis en los pezones cilíndricos. Si el argumento expuesto por (Bassalik, 1978) fuese cierto, esta explicación no aplicaría en esta investigación ya que la mayor parte de las vacas analizadas en este estudio son ordeñadas manualmente, por lo que no representa un riesgo en estos bovinos.

Volviendo con la forma del pezón en cuanto a la producción de leche, se considera a la forma de embudo como la mejor para un manejo fácil en la implementación de la ordeñadora mecánica ya que se puede adaptar de forma más fácil a las pezoneras sin importar el diámetro que represente, a comparación de el pezón cilíndrico y de botella que al ser demasiado ancho impiden o dificultan el uso de las pezoneras, y que incluso en varios casos, son la razón de heridas en los pezones haciendo aún más susceptibles a enfermarse, sin mencionar otros problemas que se pueden causar a la glándula mamaria.

La forma de punta de pezón que fue más frecuente sin duda fue la redondeada 347 (54.91%), seguido de la plana 152 (24.05%), puntiaguda 119 (18.83%), prolapsada 10 (1.58%) y como ya se había mencionado la existencia de pezones ciegos 4 (0.63%), en la investigación de (Riera *et al.*, 2005) de igual manera la forma de punta más frecuente lo fue la redondeada 52.55%, en cambio después continuo la forma puntiaguda 28.02%, plana 8.72% y prolapsada 4.3%, además de otras formas como la de disco 2.18%, cóncava o invertida 0.86% y mixta 0.12%.

En el largo del pezón en esta investigación se tomó en cuenta un promedio general de todos los pezones el cual fue de 5.4 cm, además se encontró una medida máxima de 11.5 cm y una medida mínima de 2.3 cm, medida que no permite la implementación de pezoneras y que infiere en un ordeño manual lento y difícil. El largo del pezón influye en la velocidad de ordeño y el deslizamiento de pezoneras (Rogers *et al.*, 1991), pero el ordeño a mano es más fácil en pezones cortos (Miller *et al.*, 1992), la medida más frecuente encontrada en los pezones de las vacas Holstein fue de 4.1 a 6 cm. En el diámetro del pezón se presentó una medida mínima de 1.1 cm y una medida máxima de 4 cm, una medida de mayor frecuencia de 2.1 a 2.5 cm y un promedio de 2.4 cm. Según (Ovensen, 1972) pezones con un diámetro de 2.4 cm se consideran como los más adecuados para que el ordeño sea satisfactorio, aunque se debe tomar en cuenta que el diámetro se incrementa con el número de lactancias (Chaki *et al.*, 1999), pero los pezones anchos son asociados con caídas de pezoneras (Rogers y Spencer, 1999), sin embargo, como se ha comentado anteriormente, las vacas en estudio son ordeñadas manualmente por lo que este factor no es tema de mucha importancia.

Sin dejar de lado a los pezones ciegos o disfuncionales, tienen y representan una pérdida económica para el productor o la ganadería lechera debido a que se pierden considerables ganancias en estos pezones que están sin producir lo que se considera un gran problema.

CONCLUSIÓN

La forma del pezón que tuvo mayor frecuencia de aparición en vacas Holstein fue el pezón cilíndrico, seguido de las formas embudo y botella, para la forma de punta del pezón de mayor frecuencia fue la redondeada, seguida de las formas plana, puntiaguda, y prolapsada. La localización anatómica de los pezones en la glándula mamaria no tuvo efecto al momento de realizar las variables. El número de pezones perdidos fueron 4 (0.63%). De allí la importancia del impacto económico que causan los pezones perdidos o no funcionales, en las empresas o granjas lecheras. Un diámetro promedio para el total de los pezones fue de 2.5 cm. El promedio del largo para los pezones fue 5.5 cm. Las características evaluadas en este estudio se deben relacionar, con la producción de leche y conteo de células somáticas. Los resultados obtenidos pueden ser utilizados para la estimación de parámetros genéticos como la heredabilidad, la cual es considerada, de moderada a alta en las características morfológicas del pezón, lo cual daría una buena respuesta a la selección en los programas de mejoramiento genético para la salud de ubre.

REFERENCIAS

1. Bassalik-Chabielska, L. 1978. Teat Shape of the Udder, Milkability and Incidence of Mastitis. University of Illinois. (Thesis PhD). 301-308 pp.
2. Chaki, E. K.; Ghosh, N.; Majandar, S. C. 1999. Relation- ship of Udder and Teat Types to Part Lactation Yield and Peak Yield in Primiparous Crossbred Cows. *Indian Vet. J.* 76: 58-60.
3. Chrystal, M. A.; Seykora, A. J.; Hansen, L. B. 1999. Heritabilities of Teat End Shapes and Teat Diameter and Their Relationships with Somatic Cell Scores. *J. Dairy Sci.* 82 (9): 2017-2022.
4. Hickman, C. G. 1963. Teat Shape and Size in Relation to Production Characteristics and Mastitis in Dairy Cattle. Animal Research Institute, Canada Department, Ottawa: 157. 777-782 pp.
5. Miller, R. H. 1983. Traits for Sires Selection Selection Re- lated to Udder Health and Management. *J. Dairy Sci.* 67 (2): 459-471.
6. Ovensen, E. 1972. Milking Ability in Relation to Size and Shape of the Teat. *Anim. Prod.*:15: 251-257.
7. Riera-Nieves, Mario; Rodríguez-Márquez, José M; Perozo-Prieto, Eudomar; Rizz, Rita; Cefis, Andrea. 2005. Caracterización morfométrica de los pezones en vacas Carora. *Revista Científica*, vol. XV, pp. 421-428.
8. Rogers, G. W.; Hargrove, G. L.; Lawlor, T. J.; Ebersole, J. L. 1991. Correlations among Linear Type Traits and Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.* 74 (3): 1087- 1091.
9. Rogers, G. W.; Spencer, S. B. 1999. Relationships among Udder and Teat Morphology and Milking Characteristics. *J. Dairy Sci.* 74 (12): 4198-4194.

AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Ustilago maydis*

Yolanda Mora Gutiérrez, Esmeralda Rubí Pérez Ruíz, Maribel Quezada Cruz, Victoria Enciso Tenorio y Porfirio Raúl Galicia García*

Laboratorio de Biotecnología Ambiental, División Químico Biológicas
Universidad Tecnológica de Tecámac. km. 37.5 Carr. Fed. México - Pachuca, Col. Sierra Hermosa,
Tecámac, Estado de México. *prgaliciag@hotmail.com

RESUMEN

Ustilago maydis es un hongo con patogenicidad específica para la planta del maíz (*Zea mays*), tiene gran relevancia científica debido a que es el clásico modelo de estudio de los basidiomicetos. También, es mundialmente conocido debido a su impacto en la gastronomía y sus características nutricionales. En México se considera un alimento tipo gourmet, por lo que los cultivos infectados con *U. maydis* cuadruplican su valor en el mercado si se compara con el valor comercial del grano. En este trabajo se estableció un protocolo para el aislamiento de cepas de *U. maydis* en el que se utilizaron mazorcas infectadas con el hongo, las muestras fueron colectadas en la zona de Teotihuacán, México en el año 2016. En condiciones adecuadas se realizaron diluciones de teliosporas y se sembraron en medio PDA+CA a 32°C por 24-48 hrs, posteriormente se realizaron los aislamientos y la purificación de cepas.

La observación de las diferentes cepas de *U. maydis* ya purificadas en un microscopio estereoscópico, mostraron tres formas de crecimiento de las colonias con distinto comportamiento. Algunas formaron estructuras algodonosas, otras en forma de levadura y algunas levaduras con micelio periférico en la colonia.

Con la metodología empleada se aislaron según la literatura, cepas no patogénicas, patogénicas y solopatógenicas de teliosporas individuales. La morfología de las cepas aisladas es congruente con lo reportado en la literatura, por lo que la rugosidad en las colonias y la presencia de un micelio algodonoso corroboran los resultados. Se aislaron un total de 16 cepas, las cuales corresponden por su morfología a 12 no patogénicas y patogénicas, y 4 solopatógenicas. Con dichas cepas se realizarán cruces alélicas para obtener diversidad patogénica en el hongo de una mazorca infectada. Palabras clave: *Ustilago maydis*, *Zea mays*, cepas, patogénicas, solopatógenicas.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad en México las investigaciones dirigidas a *Ustilago maydis* se enfocan principalmente en la evaluación de técnicas para el aumento de la productividad de Huitlacoche; debido a que éste es un alimento tradicional mexicano que presenta atractivas propiedades nutritivas y un exquisito sabor característico, además de una excelente cotización en el mercado (Cota, 2004).

U. maydis es un hongo basidiomiceto, patógeno, que en la naturaleza tiene una afinidad específica hacia dos plantas: el maíz (*Zea mays*) y teozintle (*Zea mays ssp. parviglumis*), causando la enfermedad del "carbón común" (Aguayo, 2016).

El hongo muestra una gran versatilidad en su patogenicidad debido a que pueden encontrarse cepas sólo patogénicas (colonias con micelio blanco y algodonoso), patogénicas (con apariencia levaduriforme y micelio) y no patogénicas (levaduriformes). En general las cepas del hongo muestran diferente grado de virulencia, esta variabilidad también la muestran los genotipos de maíz en la susceptibilidad a la enfermedad y pueden encontrarse genotipos con diferente tolerancia al hongo (Madrigal *et al.*, 2010).

Con el presente trabajo se busca obtener información de la morfología de las colonias y su relación con la patogenicidad *in vitro* de algunas cepas de *U. maydis* con características morfológicas distintivas.

TEORÍA

Se le llama Huitlacoche a las agallas o tumores que se forman en la mazorca del maíz infectadas por el hongo *U. maydis*. Su aspecto es poco agradable a la vista, sin embargo, el hongo es una comida típica mexicana de origen prehispánico que ha rebasado las fronteras de México, comercializándose en tres formas distintas: en estado fresco, congelado y enlatado (Cota, 2004).

El Huitlacoche contiene diversas cantidades de carbohidratos, proteínas, ácidos grasos (como linoleico), minerales (calcio, nitrógeno y fósforo) y vitaminas (riboflavina, niacina, biotina y ácido fólico) que en comparación con el maíz proporcionan un mayor nivel nutrimental (Valdez, *et al.*, 2009). En el Cuadro 1, se muestra la comparación de algunos elementos del maíz y el huitlacoche con marcadas diferencia.

Cuadro 1. Composición proximal del maíz vs. huitlacoche

Composición g/100g					
	Proteína	Grasa	Carbohidratos	Fibra	Ceniza
Maíz	9.4	4.1	64.66	9.20	1.4
Huitlacoche	16.4	2.3	66.5	23.5	7.0

Fuente: Valdez, *et al.*, 2009

U. maydis es un hongo perteneciente a la clase Basidiomycete, constituida principalmente por parásitos de plantas, con esporas de pared gruesa que pueden resistir largos periodos de tiempo sin germinar (Juárez, 2011).

Este hongo es el causante de la enfermedad denominada carbón común del maíz, puede atacar a sus huéspedes en cualquier estadio de crecimiento, produciendo síntomas que incluyen el desarrollo de clorosis, así como tumores o agallas en mazorcas (llamadas comúnmente huitlacoche), espigas, hojas y tallos, los cuales dan como resultado alteraciones en la morfología y fisiología de la planta como reducción en el crecimiento y la producción de grano (Agrios, 2005).

U. maydis presenta dos formas de crecimiento, fuera de la planta es levaduriforme, saprófita, haploide no patogénica, y dentro de la planta es micelial, parasítica, diploide y patogénica. Además, posee dos tipos sexuales identificados como a y b, determinados por las regiones que controlan el apareamiento compatible y la patogénesis denominados locus a y locus b (Jiménez, 2010). De acuerdo a Cota (2004), *U. maydis* en cuanto a su morfología, presenta tres formas en su ciclo de vida, basidiospora o esporidia, micelio dicariótico y teliospora, que se describen en el Cuadro 2, éstas formas también muestran diferentes condiciones nucleares.

Cuadro 2. Características morfológicas de colonias de *U. maydis*, producto de la germinación de una teliospora.

MORFOLOGÍA	CARACTERÍSTICAS
Basidiospora o Esporidia	Haploide, hialina, fusiforme, mononucleada y elongada en la base. Producto de la germinación de teliosporas y se reproduce por gemación.
Micelio dicariótico	Resulta de una fusión de líneas haploides compatibles. Éste micelio es parásito e inicialmente binucleado.
Teliospora	Es el estado diploide y está contenida dentro de las agallas, sufre meiosis y produce células haploides, mononucleadas y con forma de levadura. Dichas esporas pueden hibernar por largos periodos de tiempo y presentan la forma esférica o elipsoidal.

CICLO DE VIDA

U. maydis posee un ciclo de vida complejo (Figura 1), y necesita a su hospedero natural para completarlo, se sabe que la invasión de este hongo se genera en mazorcas de maíz, aunque también puede afectar a cualquier parte aérea de la planta y en todos los casos muestra su mecanismo biológico para inducir su infección (Kothe, 1996).

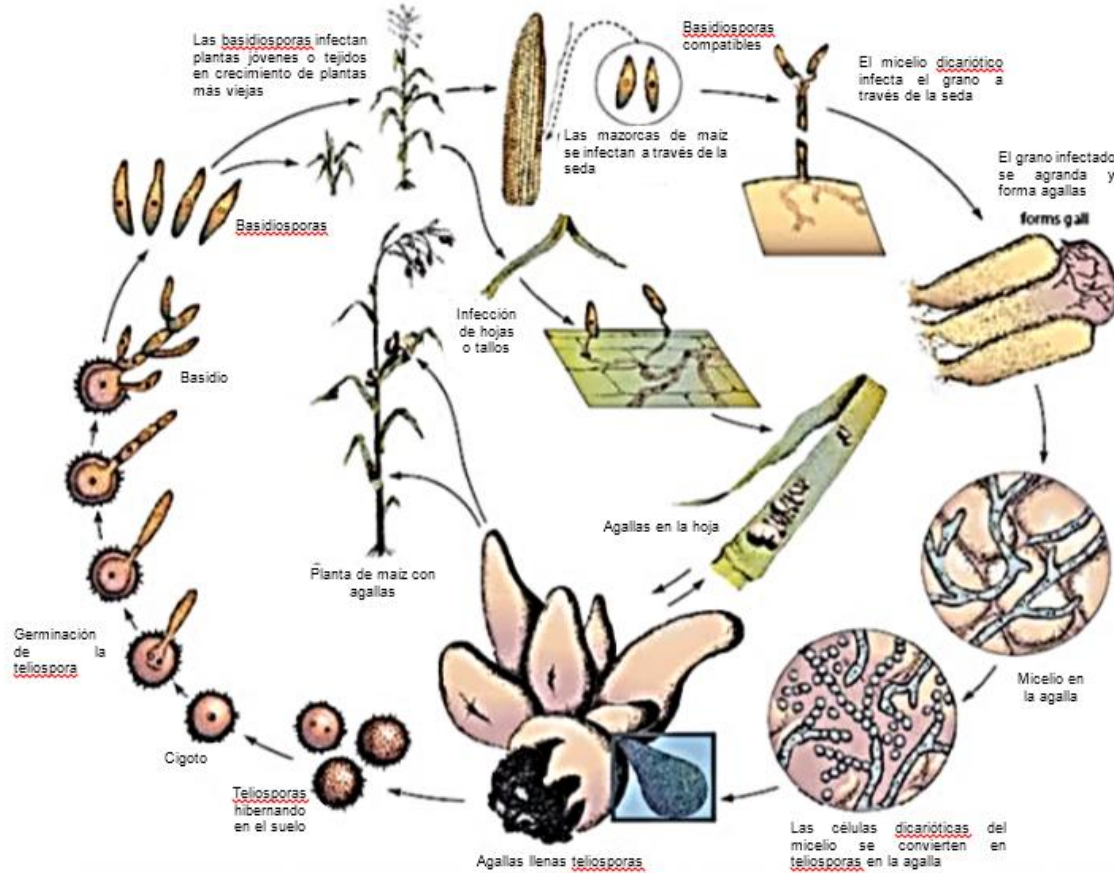


Figura 1. Ciclo de vida de *U. maydis* (Agrios, 2006 modificado).

PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento de teliosporas de U. maydis.

Para la realización de éste proyecto se emplearon teliosporas de *U. maydis*, obtenidas de agallas de tres mazorcas infectadas con huitlacoche, provenientes de la zona de Teotihuacán, Estado de México en el año 2016, las cuales fueron aisladas, en condiciones de esterilidad, mediante la inserción de una varilla de vidrio en el tumor con la finalidad de recolectar las teliosporas del centro debido a que éstas tienen menor probabilidad de contaminación, y se depositaron en 3 tubos de vidrio, identificados como: UT1, UT2 y UT3.

Germinación de teliosporas

Una vez obtenidas, se procedió a aislar de 1 a 3 teliosporas por caja Petri, para esto se pesaron 0.01 g de teliosporas en la balanza analítica marca "OHAUS Analytical Plus" y se colocaron en un tubo Eppendorf con capacidad de 2 a 3 ml, posteriormente se colocó un mililitro de solución salina estéril y una gota de Tween 20 y se agitó con vortex "IKA MS 3 basic" hasta que las teliosporas se distribuyeron en el medio.

Para cada tumor a evaluar se utilizaron 10 tubos con 900 μL de agua destilada, del tubo donde se encontraban las teliosporas se tomaron 100 μL y se colocaron en el primer tubo de 900 μL y de este se tomaron 100 μL para el siguiente tubo realizando diluciones sucesivas hasta llegar a una concentración de 10^{-10} , se inocularon 100 μL de cada dilución en un medio PDA (preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante) adicionado con 5% de Penicilina y se incubó por 48 h a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Transcurrido el tiempo de incubación, se observó que la dilución 10^{-7} proporcionó una separación óptima de teliosporas individuales. Posteriormente, cada una de las cepas obtenidas se resembró

tres veces en cajas de Petri para identificar la morfología de las cepas con ayuda de un microscopio estereoscópico OLYMPUS SZ2-ILST.

Por último, las cepas ya identificadas se conservaron de dos formas: en cajas de Petri (con medio PDA) y en medio inclinado (PDA con glicerol), ambas se almacenaron a 4 °C.

RESULTADOS

Se aislaron un total de 16 cepas, las cuales corresponden por su morfología a 12 no patogénicas y patogénicas y 4 sólo patogénicas.

La morfología de las cepas no patogénicas se muestra en la Figura 2. En 2A se muestra la colonia con un crecimiento tipo levaduriforme típico de las cepas no patogénicas con dos a tres días de crecimiento.

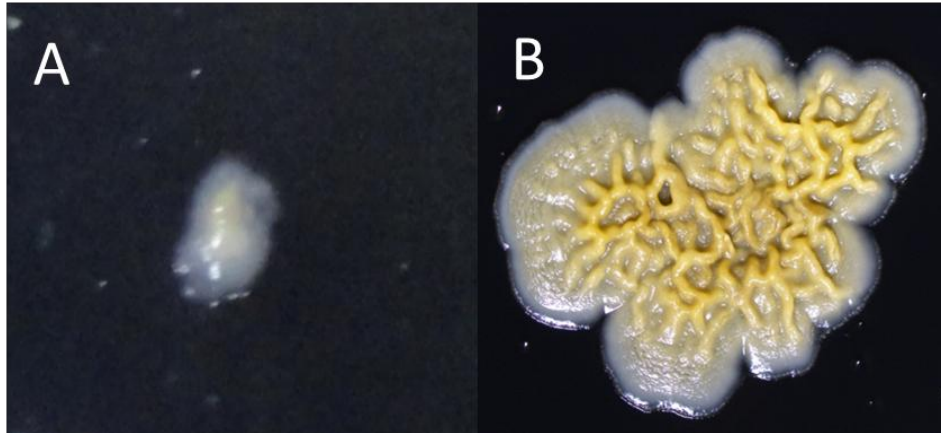


Figura 2. Colonia de *U. maydis* no patogénica producto de la germinación de una teliospora. 2A crecimiento de una semana; 2B crecimiento de varias semanas.

En la Figura 2B se aprecia una colonia típica no patogénica con más de dos semanas de crecimiento, tipo levadura, con ausencia de micelio y con rugosidad en la superficie (característica de las colonias con envejecimiento).

El desarrollo de esta cepa, puede deberse a que en la masa de esporidias (producto de la germinación de la teliospora) no se encuentran incluidas esporidias de apareamiento compatible. En las resiembras sucesivas se toma una muestra de las células de la colonia, las cuales debieron corresponder a esporidias de apareamiento no compatible, este proceso origina una colonia pura con células no compatibles y se muestra como una colonia no patogénica morfológicamente diferenciada.

En la Figura 3, se muestra una colonia típica de las cepas patogénicas con más de dos semanas de germinación de la teliospora. Su morfología de crecimiento es la forma más fácil de identificar.

El aspecto morfológico de esta colonia es de levaduriforme pero muestra un micelio tipo Fuzz⁺ en la periferia, además se puede apreciar la rugosidad típica de *U. maydis* que se presenta en las colonias con marcado envejecimiento.

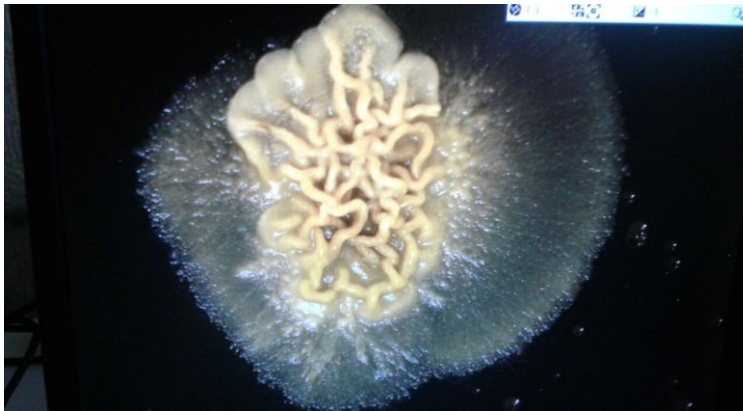


Figura 3. Colonia de *U. maydis* patogénica, producto de la germinación de una teliospora.

La obtención de esta colonia posterior a la germinación de la teliospora, resulta del apareamiento compatible entre dos esporidias con diferentes locus a y b (Ruiz, 2008). La manifestación puede deberse a que en la masa de esporidias corresponde a células de apareamiento compatible, lo que genera una colonia patogénica morfológicamente diferenciada. Estas cepas son susceptibles a disminuir su grado de virulencia al cabo de varias resiembras o bien, si en determinado tiempo no encuentran su hospedero natural (*Zea mays*).

La Figura 4 muestra una colonia denominada solopatogénica. Estas colonias se encuentran definidas como cepas diploides patógenas en ausencia de apareamiento, Sabbagh *et al.*, (2010) mencionan que *U. maydis* tiene la capacidad de producir alrededor del 3 % de estas cepas con capacidad de infección y de producir agallas.



Figura 4. Colonia de *U. maydis* solopatogénica que muestra abundante micelio tipo Fuzz⁺ en cultivo axénico, con cuatro resiembras sucesivas.

Las características morfológicas observadas anteriormente, son congruentes con lo reportado por Galicia *et al.*, (2016) quienes demuestran que existen tres tipos de colonias, el primer tipo está formado por cepas saprofitas con colonias similares a levaduras sin micelio, éstos son de aspecto brillante u opaco, de color crema o amarillo pálido y tienen una superficie lisa o áspera. El segundo tipo se caracteriza como cepas patógenas porque sus colonias similares a levaduras son blancas y tienen superficies rugosas con micelio periférico disperso en la colonia. En el tercer tipo, las colonias solopatogénicas similares a levaduras desarrollaron un micelio algodonoso tipo Fuzz⁺.

Las colonias bajo estudio se les aplicaron más de cuatro resiembras sucesivas para confirmar la morfología no patogénica o la estabilidad Fuzz⁺ patogénica, debido a que Sabbagh *et al.*, (2010)

demonstraron que después de 3 resiembras se confirma la patogenicidad o no patogenicidad de las cepas.

CONCLUSIONES

Se demuestra que con el protocolo propuesto para el cultivo axénico de *U. maydis*, se es capaz de aislar cepas de interés de una manera óptima y con mínimos recursos, en comparación con otras metodologías incluyendo la empírica y todos los retos que esta representa. Para el desarrollo del método se consideraron diversos factores, resaltando los que más influyen en el aislamiento correcto de cepas, como utilizar agallas de mazorcas jóvenes y extraer únicamente el centro de la misma para reducir la contaminación y disminuir el número de lavados.

Las observaciones microscópicas permitieron demostrar que existen diferencias en la morfología de cada una de las cepas obtenidas, contribuyendo a su correcta identificación a partir de sus características coloniales y su comportamiento en el medio de cultivo, logrando aislar un total de 4 cepas sólo patogénicas y 12 patogénicas y no patogénicas, las cuales ahora forman parte del cepario del laboratorio de biotecnología ambiental de la Universidad Tecnológica de Tecámac.

Es importante conservar la pureza de dichas cepas para poder confirmar la especie de *U. maydis* mediante herramientas de la biología molecular y también para poder realizar las cruas dialélicas *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todo el equipo de trabajo del laboratorio HB-07 de Biotecnología Ambiental de la Universidad Tecnológica de Tecámac por el tiempo, dedicación y conocimientos compartidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press. USA. 922 p.
2. Aguayo-González D.J., Acosta-Ramos M. Pérez-Cabrera L. E., Guevara-Lara F. y García-Munguía F. 2016. Producción natural de huitlacoche [*Ustilago maydis* (D.C) Corda] en el Estado de Aguascalientes. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7(5):1043-1050.
3. Cota, N.C.B., (2004). Evaluación de cepas locales de *Ustilago maydis* en maíz para la producción de huitlacoche en el Valle del Yaqui. 2003. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora. 85 p.
4. Galicia, G.P.R., Silva, R.H.V., Mendoza, O.L.E., Zavaleta, M.H.A., Córdova, T.L. & Espinosa, C.A. 2016. Selection of aggressive pathogenic and solopathogenic strains of *Ustilago maydis* to improve Huitlacoche production. Acta Botanica Brasilica 30(4): 683-692.
5. Jiménez, B.M.F. 2010. Estudio de la diversidad genética y análisis molecular del locus b de *Ustilago maydis*. Instituto Politécnico Nacional. Ciencias en Biotecnología Genómica. Reynosa, Tamaulipas. 83 p.
6. Juárez, M.M. 2011. Estudios bioquímicos y moleculares de las proteasas vacuolares del hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*. Instituto Politécnico Nacional. Secretaría de Investigación y Posgrado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F. 91 p.
7. Kothe, E. 1996. Tetrapolar fungal mating types: Sexes by the thousands. FEMS Microbiol. Rew. 18:65-87.
8. Madrigal-Rodríguez J., Villanueva-Verduzco C., Sahagún-Castellanos J., Acosta-Ramos M., Martínez-Martínez L., Espinosa-Solares T. 2010. Ensayos de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) hidropónico en invernadero. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 16(3):177-182.
9. Valdez, M.M., Valverde M.E. y Paredes L.O. 2009. Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV-Irapuato. pp. 10-37.
10. Ruiz-Herrera J. 2008. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. Nova Scientia 1(1):118-135.
11. Sabbagh, S. K., Diagne-Lèye, G., Naudan, M., & Roux, C. P. 2010. Solopathogenic strain formation strongly differs among Ustilaginaceae species. FEMS Microbiol. Lett. 305:121-127.

AMINOÁCIDOS PRESENTES DESPUÉS DE LA DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE PLUMAS DE POLLO

Valentín V., V. Enciso, M. Quezada*, P. R., Galicia y A. Garrido

Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Universidad Tecnológica de Tecámac
Km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca. Col. Sierra Hermosa. Tecámac, Edo. de México

*mabelqz@yahoo.com.mx

RESUMEN

A nivel mundial se sacrifican millones de pollos anualmente que generan toneladas de desechos de plumas. En México se estima que para el año 2018, el consumo total de pollo será de 3,274 millones de toneladas, lo cual significa que se generarán alrededor de 163.7 a 327.4 millones de toneladas de plumas, debido a que del 5 al 10% del peso total del pollo son plumas¹. En el presente trabajo se determinó la presencia de aminoácidos en la fracción soluble después de un proceso de degradación de plumas de pollo por medio de un co-cultivo de bacterias. El estudio se realizó a 35°C, 120 rpm y pH inicial de 6.8-7.2 en caldo nutritivo. Para evaluar la degradación de las plumas y el crecimiento de las bacterias, se midió la absorbancia a 620 nm, la cantidad total de aminoácidos por el método de la ninhidrina de acuerdo con Pearce *et al.* (1988) y el tipo de aminoácidos por cromatografía de gases. Se identificaron las bacterias degradadoras por la amplificación del ADN r 16S y secuenciación en la empresa Macrogen, Korea. Se concluyó que la degradación de plumas es factible a escala laboratorio en 11 días por medio de un co-cultivo. Los aminoácidos presentes en la fracción soluble después de la degradación fueron alanina, glicina, asparagina y cisteína. Las bacterias degradadoras fueron dos especies de *Alcaligenes faecalis* y *Brevundimonas diminuta*.

INTRODUCCIÓN

Generalmente se utilizan métodos físico-químicos para la degradación de plumas de pollo, entre algunos de los más comunes están la hidrólisis alcalina, hidrólisis ácido-alcalina y la pirólisis a altas temperaturas (Coward-Kelly *et al.* 2006; Mazotto *et al.* 2013).

De acuerdo con Coward-Kelly *et al.* (2006) quien utilizó un método de hidrólisis alcalina, la queratina presente en las plumas de pollo se trató con hidróxido de calcio para obtener un producto rico en aminoácidos tales como alanina, arginina, cisteína, leucina, entre otros, los cuales pudieran utilizarse como un suplemento alimenticio para animales. Otra hidrólisis utilizada para tratar plumas de pollo es la ácido-alcalina, según Reddy *et al.* (2013) consiste en emplear hidróxido de sodio y ácido cítrico para la producción de biotermoplásticos, sin embargo, son pobres en estabilidad de agua y propiedades mecánicas; por lo que ellos mezclaron la queratina extraída de las plumas con monómeros de acrilato para mejorar estas características. En los tratamientos de pirólisis a altas temperaturas, Senoz *et al.* (2012) evaluaron los cambios estructurales de las fibras de plumas de pollo después del tratamiento por calor con temperaturas de hasta 600°C, dichos cambios fueron la aparición de carbonos aromáticos y aminos libres, los cuales se detectan por técnicas de análisis acopladas con espectrometría de masas, ensayos de solubilidad y cromatografía de permeación en gel, los análisis que se realizaron dieron como resultado el perfil de pirólisis para crear materiales y fibras resistentes a altas temperaturas con aplicación en la industria textil.

Por otro lado, los tratamientos biológicos han dado un resultado favorable en la degradación de plumas de pollo. Algunos microorganismos utilizados son cepas puras, actinomicetos, hongos y consorcios de bacterias; las bacterias más utilizadas son *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* (Vasileva *et al.* 2009; Mazotto *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014; Fakhfakh *et al.* 2014). Sin embargo, en nuestro país son pocos los grupos de investigación dedicados al estudio y generación de tecnología para minimizar el problema de degradación de las plumas. Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó la factibilidad de degradar plumas por un método biológico y se identificaron algunos aminoácidos solubles después de la degradación para su posible recuperación y reutilización en industrias con giro cosmético y/o alimentario.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Preparación de las plumas: Las plumas se lavaron con agua del grifo y se dejaron secar durante 24 horas a 60 ° C. Se pesaron cinco gramos y se lavaron 2 veces en agua hirviendo durante 5 minutos

antes de colocarlos en matraces de un litro con un volumen de trabajo de 500 ml. Una mezcla de $5.3 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5$ CFU de la cepa 1 y $5.0 \times 10^5 \pm 0.25 \times 10^5$ UFC de la cepa 2 crecidas previamente en caldo nutritivo se añadió a los matraces. Las condiciones del cultivo fueron: agitación 120 rpm, pH 6.8-7.2 y 35 °C durante 14 días. Se evaluó la degradación de la pluma con las cepas puras separadas y como co-cultivo. El estudio se realizó por triplicado y todos los reactivos utilizados en el estudio fueron grado analítico de la marca Merck y Bioxon.

a) Crecimiento y degradación de plumas

Se midió el crecimiento de las bacterias y la degradación de la pluma por medio de detección de la absorbancia del cultivo a 620 nm, en un espectrofotómetro UV/VIS JENWAY, 67 series Spectrophotometer.

b) Presencia y/o concentración de aminoácidos solubles

Después del proceso de degradación de las plumas. Se filtraron muestras a través de papel filtro de fibra de vidrio Whatman (GF/A de 22 mm de diámetro) y se determinó la concentración de aminoácidos de acuerdo con el método de la ninhidrina (Moore, 1954). El tipo de aminoácidos se determinó por medio de un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, clarus 550 y se utilizaron estándares de aminoácidos (Glicina, Alanina, Asparagina, Gutamina, Cisteína y Triptófano).

c) Identificación molecular de microorganismos

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el método CTAB como se indica por (Minas et al., 2011). La amplificación de ADNr 16S se realizó en un termociclador Perkin-Elmer 2400 utilizando los siguientes primers universales: FD1 (5'-agagtttgatcctggctcag-3') y RP1 (5'-acggttacctgttacgactt-3') (Weisburg et al., 1991). La PCR se realizó con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, y cada ciclo con una desnaturalización a 95 °C durante 30 s, una alineación a 48 °C durante 30 s, una extensión a 72 °C durante 90 s, y una extensión final a 72 °C durante 8 min, con un total de 35 ciclos (Weisburg et al., 1991). Los productos de PCR fueron secuenciados por la empresa MacroGen Korea; se describieron como la secuencia parcial de ADNr 16S. Se realizó una alineación BLAST para determinar el género y la especie.

d) Microscopía electrónica de barrido

Se tomaron muestras para observar en un microscopio electrónico de barrido marca Jeol JCM-6000 Benchtop SEM, la degradación de las fibras de queratina y la presencia de las bacterias degradadoras. Se fijaron las muestras en glutaraldehído (3,0%) en tampón de fosfato (0,1 M, pH 7.2) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron 2 veces con agua desionizada y se dejaron reposar en agua desionizada durante 40 min. La post-fijación se realizó en tetróxido de osmio (1%) durante una hora y luego las muestras se enjuagaron con buffer de fosfato. Después de la fijación posterior, las muestras se deshidrataron en una serie de alcoholes a diferentes concentraciones y se secaron hasta un punto crítico. A continuación, se recubrieron con una capa delgada de oro-paladio durante 60 segundos utilizando un pulverizador de iones de capa fina Jeol, JFC-1100. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6390 a 5, 000 y 10, 000 x.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

a) Crecimiento y degradación de las plumas.

El crecimiento de las bacterias por separado y como co-cultivo permitió observar (figura 1) que hay diferencia durante los 14 días de degradación de las plumas. En el caso de *Alcaligenes faecalis* LR2, se observa que no hubo crecimiento y visualmente no hubo degradación. En el caso de *Alcaligenes faecalis* LR1 y *Brevundimonas diminuta* tuvieron un comportamiento similar, es decir, para el día 8 se inició la etapa logarítmica de crecimiento y para el día 19 se tuvo la etapa estacionaria (datos no mostrados), sin embargo no hubo degradación de la pluma (observación visual). El co-cultivo tuvo una etapa logarítmica de crecimiento desde el primer día de contacto de las bacterias con las plumas, de tal manera que su máximo crecimiento se dio el día 9 y del día 10 al 14 se dio la etapa estacionaria (etapa en la que se tuvo la total degradación de la pluma).

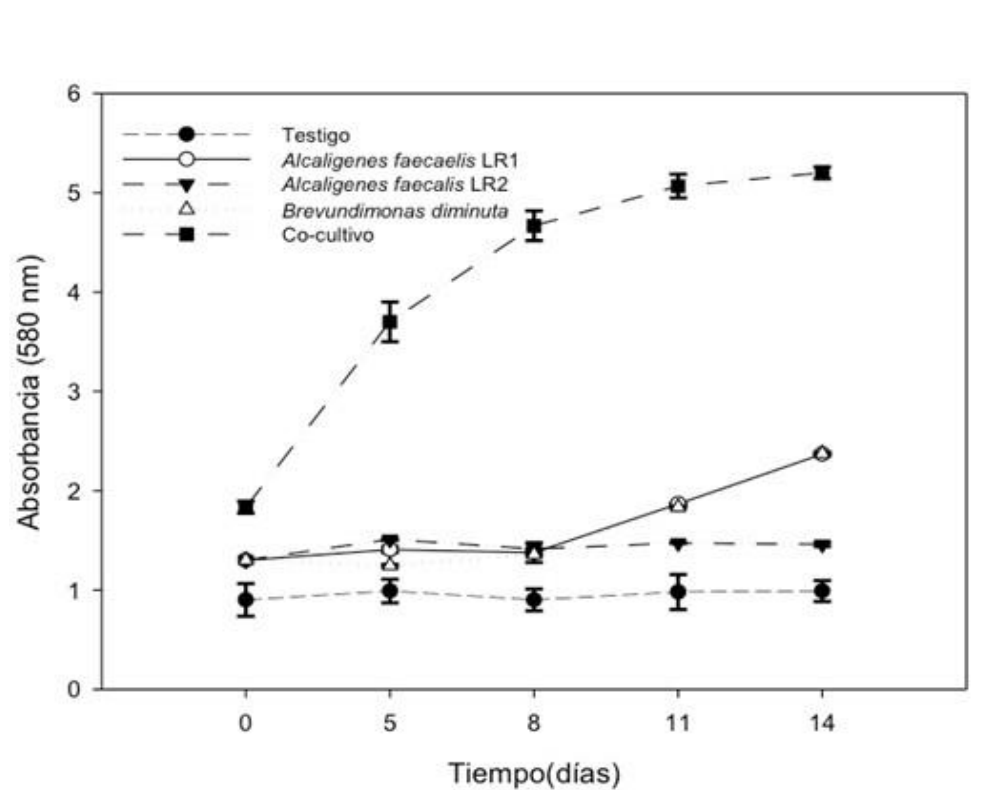


Figura 1. Degradación de plumas de pollo por medio de consorcio de bacterias

Se han reportado algunas bacterias como *B. megaterium* SN1, *B. thuringensis* SN2, *B. pumilis* SN3 que han presentado una fase lag de crecimiento de 24 a 48 hrs (Agrahari et al., 2010). En el presente trabajo el co-cultivo (Fig 1) tuvo un crecimiento rápido desde los primeros días y no presentó fase lag. Cuando las cepas son utilizadas por separado presentan una fase lag de 8 días, por lo cual es recomendable mejor el uso del co-cultivo. Algunos autores han observado que la combinación de plumas y alguna fuente de carbono (glucosa, fructosa, galactosa, manitol, almidón soluble, etc.) causa una alta producción de la enzima queratinolítica (Park, 2009). Esto concuerda con lo obtenido en el presente estudio, pues la adición de caldo nutritivo al co-cultivo permitió aumentar la actividad queratinolíticas de las bacterias.

b) Identificación molecular

El análisis de las secuencias en el Genbank del DNA amplificado por PCR, mostró que corresponden a la amplificación parcial del gen 16S del rDNA. Las secuencias de los fragmentos de ADN obtenidos mediante los iniciadores fD1 (5'-ccgaattcgtcgacaacagagtttgatcctggctcag-3') y rP1 (5'-cccgggatccaagcttacggttacctgttaccgactt-3'), fueron alineados usando software Blastn nucleótido a nucleótido, las que mostraron aproximadamente 1500 pb. Las secuencias revelaron una alta identidad de secuencia (96% de similaridad) que corresponde a *Alcaligenes faecalis* LR1 (accesión KX118704) para una primera cepa, en una segunda cepa mostró el 97% de similaridad con la identidad de *Alcaligenes* sp. LR2 (accesión KU494828.1), y una última cepa reveló que el fragmento amplificado muestra el 98% de similaridad para *Brevundimonas diminuta* (accesión KF453789.1). Dille et al. (2016) aisló *Brevundimonas* de plumas de ave de *Junco hyemalis* en medio R2A (p-cicloheximida), esta bacteria creció en queratina y exhibió actividad de lipasa, lo que sugiere que estas enzimas aisladas pueden degradar las plumas. Por sí solos, ninguna de las tres especies de bacterias identificadas en este estudio pudo degradar completamente las plumas; sin embargo, cuando las tres bacterias actuaron juntas en un co-cultivo, pudieron degradar las plumas, incluido el raquis, en 11 días. Estos datos muestran un comportamiento similar al informado por Vasileiva-

Tonkova et al. (2009) quienes mencionan que los cultivos mixtos de actinomicetos con *Bacillus* sp. y *Streptomyces* sp. degradan plumas de forma más rápida y completa en comparación con cultivos de cepas puras. Vale la pena señalar que, después de 48 h de crecimiento, la concentración de proteína soluble obtenida, con la mezcla de sus bacterias, fue dos veces mayor que la obtenida con el cultivo de cepas puras.

c) *Identificación de aminoácidos*

En este estudio, la producción de aminoácidos libres fue de 2.64 mg/ml y se detectó triptófano y tirosina mediante espectrofotometría de luz ultravioleta después de 14 días del proceso de degradación. Kani et al. (2012) informó la concentración de proteína soluble y aminoácidos durante la degradación de la pluma por *Pseudomonas microphilus* y *Leuconostoc* sp. después de 10, 20 y 30 días de degradación, la concentración máxima de proteína fue de 0.548 y 0.118 mg/ml con *Pseudomonas microphilus* y *Leuconostoc* sp. respectivamente en 30 días, y la concentración máxima de aminoácidos fue de 1.992 y 1.682 mg/ml con *Pseudomonas microphilus* y *Leuconostoc* sp. respectivamente al mismo tiempo.

En la figura 2 se muestran los aminoácidos encontrados en la parte soluble después de la degradación de las plumas, los cuales fueron Glicina, Alanina, Asparagina, Glutamina y Cisteina.

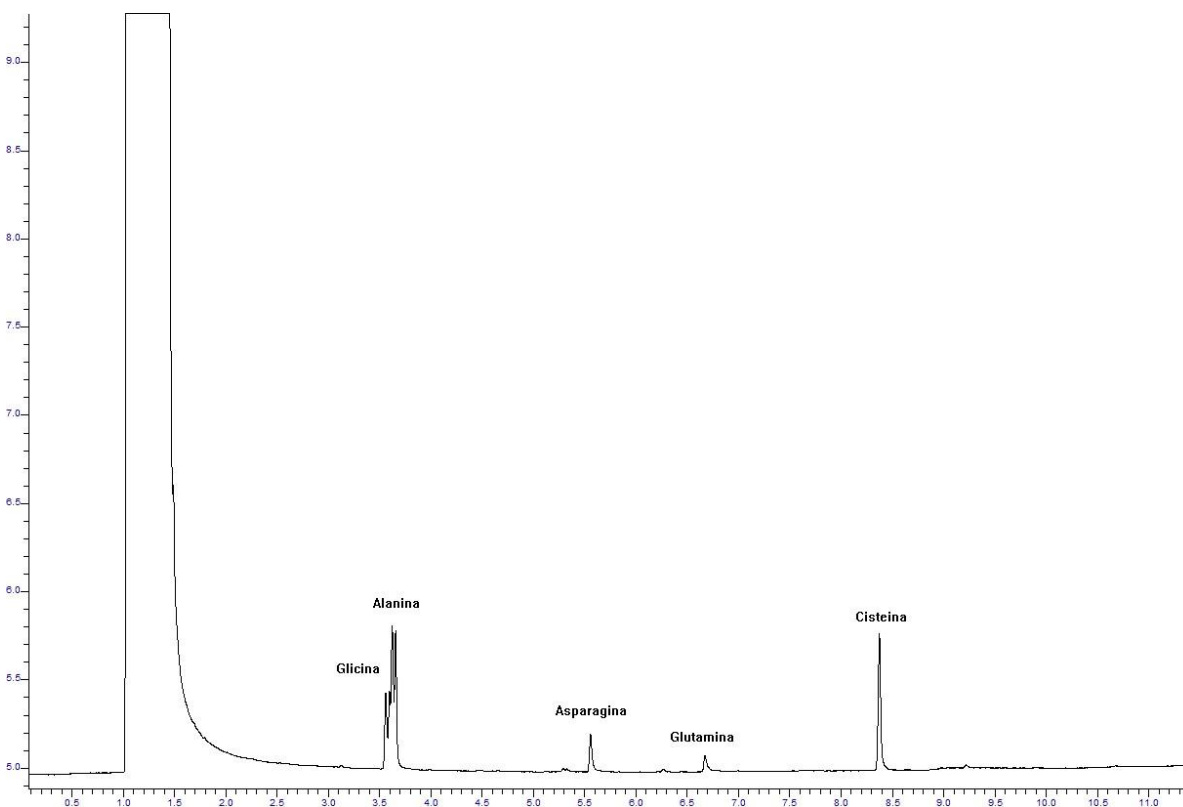


Figura 2. Aminoácidos presentes en la parte soluble después de la degradación de las plumas.

Nam et al. (2002) que realizaron un estudio sobre la degradación de plumas en condiciones termófilas con *Fervidobacterium islandicum* AW-1, encontraron que los aminoácidos producidos después de la degradación eran histidina, cisteína y lisina (que pertenece a las plumas). También encontraron aminoácidos esenciales como la metionina y el triptófano, que están presentes en baja concentración en la queratina de plumas.

Cabe mencionar que lo obtenido en el presente trabajo es un avance parcial de la detección de aminoácidos. Actualmente se están llevando a cabo más pruebas para detectar otros aminoácidos presentes en la estructura de la queratina.

d) *Microscopía electrónica de barrido*

El estudio de microscopía electrónica mostró que, en una primera etapa, las bacterias degradaron las barbillas de las plumas (durante 9 días); en una segunda etapa, las bacterias formaron estructuras redondas y elípticas alrededor del raquis para degradarlo. El estudio reveló la presencia de bacterias en forma de bacilos sobre las fibrillas de la pluma (figura 3) durante el proceso de degradación, y una gran cantidad de bacterias en el sedimento formado después de la degradación (Figura 4).

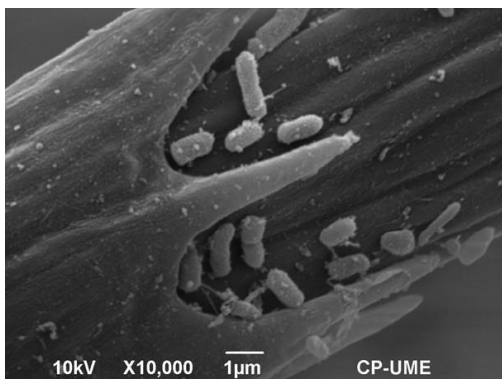


Figura 3. Bacterias en una fibrilla de queratina durante la degradación de la pluma.

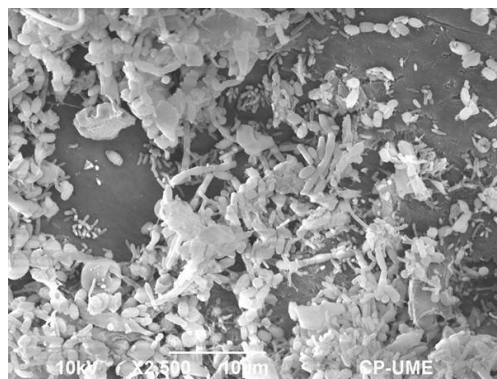


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido después de la degradación de las plumas.

Algunos estudios han utilizado la microscopía electrónica de barrido para verificar la degradación de las plumas con diferentes microorganismos, por ejemplo Al-Musallam et al. (2013) se dieron cuenta de la degradación de las plumas utilizando hongos, mostraron densas biopelículas de micelio fúngico que se unen a las fracciones de plumas, obtuvieron plumas descompuestas en tres semanas. Además, Jeong et al., (2010) estudiaron la degradación de plumas de pollo usando *Stenotrophomonas maltophilia* R13 y verificaron la degradación mediante microscopía electrónica de barrido. Informaron que las barbillas se degradaron a 2 días de incubación y el eje de la pluma a 4 días de incubación; también informaron un agregado de bacterias incrustadas en una matriz extracelular que se adhiere a la superficie de degradación.

CONCLUSIONES

El estudio mostró que es factible la degradación de las plumas por medio de un co-cultivo de bacterias a 35 °C, 150 rpm y 14 días. Se obtuvo una concentración de aminoácidos de 2.6 mg/L después de la degradación de las plumas y los aminoácidos presentes de acuerdo con la espectrofotometría UV-VIS fueron tirosina y triptófano y con la cromatografía de gases fueron Glicina, Alanina, Asparagina, Glutamina y Cisteína. Las especies de bacterias identificadas fueron dos subespecies de *Alcaligenes faecalis* y *Brevundimonas diminuta*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo técnico de Valencia Ramírez Valentín (p. Ing. en Biotecnología) y de Victoria Enciso Tenorio (IBT). Agradecemos a Dra. Hilda Zavaleta Mancera, del Colegio de Postgraduados por brindar apoyo técnico y financiero en el uso del microscopio electrónico de barrido.

REFERENCIAS

1. Agrahari S, Wadhwa N. (2010). Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at ghazipur poultry processing plant. *Int. J. Poultry Sci.* 9:482-9.
2. Al-Musallam, A. A., Al-Gharabally, D. H., & Vadakkancheril, N. (2013). Biodegradation of keratin in mineral-based feather medium by thermophilic strains of a new *Coprinopsis* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 79: 42-48.

3. Coward-Kelly G., Vincent S. Chang, Frank K. Agbogbo, Mark T. (2006). HoltzappleLime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1. Chicken feathers. *Bioresource Technology*. 97: 1337–1343.
4. Dille JW, Rogers CM, Schneegurt MA. (2016). Isolation and characterization of bacteria from the feathers of wild Dark-eyed Juncos (*Junco hyemalis*). *The Auk*. 133:155-67.
5. Fakhfakh N, Ktari N, Haddar A, et al. (2011). Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process Biochem*. 46:1731-7.
6. Jeong, J.-H., Park, K.-H., Oh, D.-J., Hwang, D.-Y., Kim, H.-S., Lee, C.-Y., & Son, H.-J. (2010b). Keratinolytic enzyme-mediated biodegradation of recalcitrant feather by a newly isolated *Xanthomonas* sp. P5. *Polymer Degradation and Stability*. 95(10):1969-1977.
7. Kani TP, Subha K, Madhanraj P, et al. A. P. (2012). Degradation of chicken feathers by *Leuconostoc* sp. and *Pseudomonas microphilus*. *Euro. J. of Exp. Biol*. 2:358-62.
8. Liu Q, Zhang T, Song N, et al. Purification and characterization of four key enzymes from a feather-degrading *Bacillus subtilis* from the gut of tarantula *Chilobrachys guangxiensis*. (2014) *Int Biodeterior Biodegradation*. 96:26-32.
9. Mazotto AM, Couri S, Damaso MCT, et al. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. (2013). *Int Biodeterior & Biodegradation*. 85:189-95.
10. Minas K, McEwan NR. Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. (2011). *FEMS Microbiology Letters*. 325:162-9.
11. Moore S, Stein WH. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem*. 1954; 211: 907-13.
12. Nam GW, Lee DW, Lee HS, et al. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch. Microbiol*. 2002;178:538-47.
13. Park GT, Son HJ. (2009). Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiol Resear*. 164:478-85.
14. Reddy N, Chen L, Yang Y. (2013). Biothermoplastics from hydrolyzed and citric acid Crosslinked chicken feathers. *Mater Sci and Eng C*. 33:1203-8.
15. Senoz E., Wool R. P., McChalicher C., Hong C. H. (2012). Physical and chemical changes in feather keratin during pyrolysis. *Polymer Degradation and Stability* 97:297-307.
16. Vasileva-Tonkova, E., Gousterova, A., & Neshev, G. (2009). Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(8): 1008-1012.
17. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 173:697-703.

EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AS EN SUELO Y CHILE (CAPSICUM ANNUUM) EN UNA ZONA AGRÍCOLA COLINDANTE A JALES MINEROS EN MORELOS, ZACATECAS.

Dulce María Orozco Corona¹, Consuelo Letechipia de León², Héctor René Vega Carrillo^{1,2}, Irma Gavilan García³

¹Doctorado en Ingeniería y Tecnología Aplicada. Universidad Autónoma de Zacatecas. Correo electrónico: ing.dulceorozco87@gmail.com, ²Unidad Académica de Estudios Nucleares. Universidad Autónoma de Zacatecas. Correo electrónico: crenchelo@gmail.com, ³Facultad de Química. Unidad de Gestión Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. Correo electrónico: irmac@unam.mx

RESUMEN

La inocuidad de los alimentos es un medio para proteger el desarrollo económico y sostenible de un país y a su vez promover y cuidar la salud pública siendo un desafío a nivel mundial. Los riesgos para la salud humana en la ingesta de alimentos pueden deberse a causas de orden biológico, químico o físico. La contaminación por Arsénico es un serio problema para la salud humana. Entre los principales riesgos a la salud por la ingesta de As se encuentran: diabetes, neuropatías, conjuntivitis, agrandamiento de hígado, cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otros. El objetivo de la investigación fue evaluar la concentración de As en suelo y chile (*Capsicum Annuum*) en raíz, tallo y fruto en 9 campos agrícolas en el municipio de Morelos, Zacatecas, una zona agrícola con historial minero. La concentración de los análisis se midió por EAA-GH por triplicado. El valor promedio de las concentraciones para As en suelo se encontraron fuera de los límites especificados por la norma mexicana nom-147-SEMARNAT/SSA1-2004 con un promedio total de 78.005 mg/kg contra 22 mg/kg que establece la norma, la USSR Health Ministry de Rusia (1988) establece el límite máximo de 2 mg/kg en suelo. Para el caso del fruto y planta se compararon los resultados de las concentraciones con las reportadas por la normativa internacional China (GB 2762-2005) que establece un límite máximo permisible de 0.5 mg/kg y la Rusia (USSR Health Ministry, 1998) de 0.2 mg/kg en base a estas normas todas las muestras excedieron los límites máximos permisibles. Las concentraciones de As encontradas en suelo y chile resultaron relevantes siendo este último de amplia demanda y consumo en la dieta mexicana. Es de suma importancia monitorear el área y realizar actividades de remediación que contribuyan a mejorar la salud de la población y la comercialización de sus productos.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental es un tema alarmante y de gran trascendencia a nivel mundial puesto que es un fenómeno que afecta directa o indirectamente la salud y bienestar de los ecosistemas y en particular de la población. Un área prioritaria dentro del interés de contaminación ambiental es la contaminación agrícola. La contaminación agrícola es considerada como contaminación difusa ya que su origen no está claramente definido y puede tener varios focos contaminantes emisores (Patil, 2012).

Es de importancia el conocer la contaminación agrícola para saber las fuentes, orígenes de los contaminantes y tipos de contaminantes (orgánicos o inorgánicos). La contaminación difusa en suelo agrícola es uno de los temas estratégicos en países desarrollados como la Unión Europea en donde se busca entre otras cosas implementar la legislación ambiental y las actividades de remediación para un manejo sustentable en áreas agrícolas, así como garantizar la seguridad alimentaria (Fabiatti et al., 2010) y minimizar el impacto ambiental.

Uno de los principales problemas en la contaminación agrícola es la contaminación por medio de metales pesados (MPs), debido a que la mayoría de los metales pesados tienen efectos tóxicos cuando se encuentran en ciertas concentraciones sobre los organismos y prácticamente son indestructibles (Cubadda et al., 2010). Asimismo, se han detectado concentraciones nocivas para la salud en productos de consumo humano. Las altas concentraciones de MPs, la acumulación en el medio ambiente y particularmente en el suelo, del cual pueden ser transferidos a los organismos por cualquier vía del suelo, agua o planta a la cadena alimentaria (Antón & Lizaso, 2010; ATSDR, 2007).

El As como sustancia tóxica por orden de importancia ocupó el primer lugar entre las 10 primeras sustancias peligrosas de la lista de prioridades 2007 por la Agencia Americana para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, 2007). La presencia de metales en los suelos es más evidente en lugares conocidos por su contaminación (Herawati et al., 2000).

Los metales pesados comúnmente encontrados en los sitios mineros han sido descritos y asociados con contaminación y toxicidad (Smith, 1991). La transferencia de los MP entre suelo-planta es la principal vía de exposición humana (Cui et al., 2004).

Existe una gran relación entre: áreas agrícolas cercanas a zonas mineras, metales pesados, contaminación del suelo agrícola e impactos ambientales estudios anteriores señalan que algunos de los impactos ambientales más comunes en estas áreas son: daño en la vegetación, acidez del suelo, concentración de metales pesados y problemas en la salud (Mandal & Suzuky, 2002; Smith & Alston, 1998).

Es común detectar la presencia de metales pesados en pequeñas concentraciones en el suelo, agua y planta en parcelas cercanas a jales mineros. Sin embargo, al exceder ciertos límites o niveles debido a los contaminantes traídos del exterior la contaminación del suelo ocurre y los productos agrícolas se vuelven productos contaminados (Arao et al., 2010).

El arsénico y los metales pesados presentan un alto riesgo de contaminar el suelo ya sea por medio de corrientes de viento o del Drenaje Ácido de Mina (DAM). Esta contaminación alcanza los suelos agrícolas debido a su infiltración a los sistemas fluviales cercanos. Durante el proceso de crecimiento del cultivo estos contaminantes derivados o provenientes de los efluentes mineros son absorbidos a través de las raíces o bien depositados sobre el área foliar (Mohammad et al., 2010; VIVO et al., 2009).

Algunos de los metales pesados, derivados de actividades mineras, que presentan actualmente graves problemas sociales y ambientales son el Arsénico (As) y el Cadmio (Cd). Al absorber los productos agrícolas una gran cantidad de As o Cd e ingresarlos a la cadena alimenticia por medio de la ingesta de comida representan un gran riesgo de intoxicación y de salud de las personas (Tomohito et al. 2010; Carbonell-Barrachina et al., 2009).

Las prácticas de agricultura intensiva producen grandes descargas de lixiviados que se incorporan a los afluentes y mantos freáticos, generando tanto un problema de inocuidad local como global. Siendo necesario el uso de técnicas de muestreo no puntual para realizar la determinación de las fuentes de contaminación, haciendo posible realizar el muestreo de presencia de contaminantes a través de la ubicación geográfica en donde son producidos los alimentos (Tiwari et al., 2011).

El análisis integral de las concentraciones de elementos químicos presentes en los cultivos permite conocer tanto su toxicidad como su aporte nutrimental, siendo una valiosa herramienta para la integración de políticas regionales del manejo integrado de cultivos donde es necesario realizar un balance entrada-salida del sistema de producción con la finalidad de determinar las fuentes de contaminación y los contaminantes generados por los sistemas de producción (FAO, 2008).

La identificación de los componentes tóxicos presentes en los alimentos ha tomado últimamente un papel preponderante en las discusiones sobre seguridad agroalimentaria. Sin embargo, la alta demanda de alimentos, la sequía, la erosión, la contaminación de los mantos freáticos ha llevado a los productores a utilizar cada vez más productos nocivos para el ambiente (Kabala & Singh, 2001). Por otra parte, la industria minera incluye actividades de extracción, molienda, procesamiento, refinamiento y eliminación de residuos (Barbour, 1994). En muchas de las formas de la minería, la producción de desechos o jales puede causar grandes alteraciones y muy duraderas para el suelo. (De Haan & Zwerman, 1978). No obstante, entre estos los micronutrientes, pueden alcanzar niveles en los suelos que son particularmente tóxicos para los microorganismos, flora, fauna silvestre y vida humana. El término metal tóxico es solamente aplicado a los elementos considerados no esenciales para la vida aunque los de mayor interés y más tóxicos son el Cd, Hg, Pb y As. Tales elementos no solo poseen un riesgo significativo para la salud sino que además, disminuyen la producción de los cultivos (D'Amore et al., 2005).

Otra fuente de contaminación por metales pesados es el riego con aguas negras, que estando cerca de zonas mineras mayormente contienen metales pesados. La presencia de estos metales en la hortaliza los vuelve biodisponibles, biomagnificándose en la cadena alimentaria y alimenticia; lo que se convierte en un problema de salud pública y contaminación del medio ambiente (Alloway, 1990).

Zacatecas es un estado históricamente minero tanto de metales preciosos como de aditivos pétreos. La presencia de indicadores de contaminación de metales pesados tanto natural como inducida por la actividad humana en zonas mineras ha sido estudiada en diversos trabajos de investigación (Pérez, 2015; González, 2015; Santos-Santos et al., 2006). Sin embargo, respecto al estudio del impacto en la calidad de los productos, la adecuación a estándares internacionales, la preocupación por la salud de los habitantes y del ecosistema aún quedan muchas vertientes por explorar y aunar esfuerzos relativos a mejorar la calidad y esperanza de vida en las regiones productivas.

El municipio de Morelos se localiza en la región centro o de los valles del estado en las coordenadas 102° 36' 45" longitud oeste y 22° 53' 12" latitud norte a una altura 2 348 metros sobre el nivel del mar.

Dado a la necesidad de explorar las características químicas del producto agrícola de consumo y exportación: *Capsicum Annum* cultivado en el municipio de Morelos, Zacatecas el objetivo de la investigación fue determinar la concentración de As en el suelo y el fruto (raíz, tallo y chile) en donde se ubican varias parcelas cercanas a jales mineros y comparar los resultados con normativas nacionales e internacionales.

TEORIA

Zacatecas es un estado cuya economía se basó en la minería y hoy, en algunos antiguos pueblos los productores tienen sus parcelas cercanas a compañías mineras, jales y plantas de beneficio, cuyos desechos mineros contienen metales pesados que entran en contacto con los cultivos (Herrera, 2013).

La importancia del chile en Zacatecas radica en su producción anual a nivel nacional, ocupando el primer lugar en el año 2009 al producir alrededor de 37000 hectáreas ese año (SIAP, 2009). Las regiones productoras de Zacatecas contribuyeron con un 34% a la producción de México.

Esta hortaliza es cultivada en los municipios de la región central: Fresnillo, Villa de Cos, Calera de Víctor Rosales, Gral. Enrique Estrada, Morelos, Vetagrande y Guadalupe (Bravo et al., 2010). El chile para secado es la opción agrícola que ofrece mayores ingresos, ya que genera el 21% del ingreso agrícola estatal. También, es la principal fuente de empleo en el medio rural y demanda un promedio de 150 jornaleros por hectárea plantada (De la Vega, 2008).

METODOLOGÍA

El trabajo de investigación se realizó en la zona agrícola de Morelos, Zacatecas, ubicada en el noroeste del municipio. El total de agricultores interesados en llevar a cabo la determinación de Arsénico en sus parcelas y cultivos fue de 8 adicionalmente se agregó un noveno sitio correspondiente a un sitio de jales mineros cercano a las parcelas esto para la matriz de suelo; para la matriz de chile (raíz, tallo, fruto) únicamente se consideraron las 8 parcelas agrícolas. La tabla 1 muestra las coordenadas de las parcelas y jal minero.

Tabla 1. Coordenada de los puntos de muestreo.

MUESTRA	Y	X
M1	22.8041944	-102.669889
M2 (JALES MINEROS)	22.8024444	-102.681583
M3	22.8148889	-102.685361
M4	22.8209722	-102.692361
M5	22.8298056	-102.692639
M6	22.8300556	-102.691944
M7	22.8555278	-102.687556
M8	22.8250556	-102.70775
M9	22.8073333	-102.712611



Fig. 1. Ubicación de los puntos de muestreo.

Para determinar el número y tamaño de las muestras de suelo se hizo referencia de la norma NMX-132-SCFI-2006 ("Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra"). El tipo de muestreo fue aleatorio, se tomaron aleatoriamente puntos de muestreo de suelo a 15 cm de profundidad, de igual forma en cada punto de muestreo se tomaron muestras de chile (raíz, tallo y fruto).

Una vez tomadas las muestras se etiquetaron y almacenaron para posteriormente llevarlas al Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental ubicado en la Universidad Autónoma de Zacatecas y se dejaron 2 semanas para retirar cualquier tipo de humedad. Posterior a ello se tomaron 0.5 gramos por muestra, se retiró la materia orgánica, se secaron a 80 C, se molieron en un mortero y tamizaron con una malla del #10, se pesaron y fueron almacenadas para su digestión.

La determinación del contenido de As en suelo y planta involucra la destrucción total o parcial de la muestra, con el fin de lograr la disolución del metal se llevó a cabo la digestión cerrada (HCl + H₂N₂O₂, 3:1) y se logró la disolución de las muestras en suelo y planta (raíz, tallo y fruto). Para ello se pesó aproximadamente 0.1 gramos de cada muestra en una balanza analítica marca Ohaus N1111 de 4 dígitos y se le adicionó 5 ml de HNO₃ grado ultrapuro de forma directa (predigestión) dejando en reposo durante un periodo de 24 horas. La digestión se realizó en el laboratorio de geoquímica del agua en el área de Geociencias de la Universidad Autónoma de México campus Juriquilla. Las muestras se sometieron al horno de microondas marca CEM MarsX press a diferentes temperaturas para realizar la digestión en un lapso aproximado de 30 minutos, una vez digeridas las muestras se le adicionó 1 ml de Ácido Clorhídrico y cada muestra se trasvasó y aforó a 50 ml con agua destilada. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su análisis para ser cuantificadas por la técnica analítica de absorción atómica.

Con el objeto de determinar la concentración de As en las muestras se utilizó el equipo Perkin-Elmer modelo 2380 por generación de hidruros en donde cada muestra se midió 5 veces y se obtuvo el promedio por muestra. Se obtuvieron mapas de isoconcentración con los valores obtenidos.

CONCLUSIONES

a) Suelo

A efecto de comparar los resultados con normativas nacionales e internacionales se elaboró siguiente tabla 2:

Tabla 2. Normas de Suelo y Chile.

MATRIZ	REFERENCIA	LÍMITE MÁXIMO PERMITIDO
SUELO AGRÍCOLA	NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004	22 mg/Kg
SUELO AGRÍCOLA	USSR Health Ministry de Rusia (1988)	2 mg/Kg
SUELO AGRÍCOLA	Bowie y Thornton (1985)	40 mg/Kg
SUELO AGRÍCOLA	García-Navarro (2005) Unión Europea	20-50 mg/Kg
SUELO AGRÍCOLA	Bergmann (1993)	20 mg/Kg
CHILE	Normativa internacional China (GB 2762-2005)	0.5 mg/kg
CHILE	Normativa Internacional Rusa (USSR Health Ministry, 1998)	0.2 mg/kg

La Tabla 3 muestra los resultados de la concentración de As en suelo expresado en mg/kg. Se analizaron un total de 37 muestras de suelo.

Tabla 3. Resultado de Arsénico en suelo.

#P _{suelo}	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	X _m	DS
P ₁	48.72 5	44.466	52.268	40.49 4	42.360	-----	-----	45.663	4.797
P ₂	355.6 5	351.64 7	352.84 7	-----	-----	-----	-----	353.382	2.055
P ₃	72.41 7	70.487	64.702	72.62 7	65.838	-----	-----	69.214	3.717
P ₄	88.58 8	103.40 3	95.145	87.39 1	96.491	86.918	105.80	94.820	7.678
P ₅	56.90 2	53.727	53.637	-----	-----	-----	-----	54.755	1.860
P ₆	60.34 9	52.141	52.972	-----	-----	-----	-----	55.154	4.518
P ₇	22.17 4	22.833	19.067	-----	-----	-----	-----	21.358	2.011
P ₈	23.73 9	26.895	18.591	19.36 8	20.590	-----	-----	21.837	3.442
P ₉	34.03	33.93	34.56	-----	-----	-----	-----	34.17	0.340

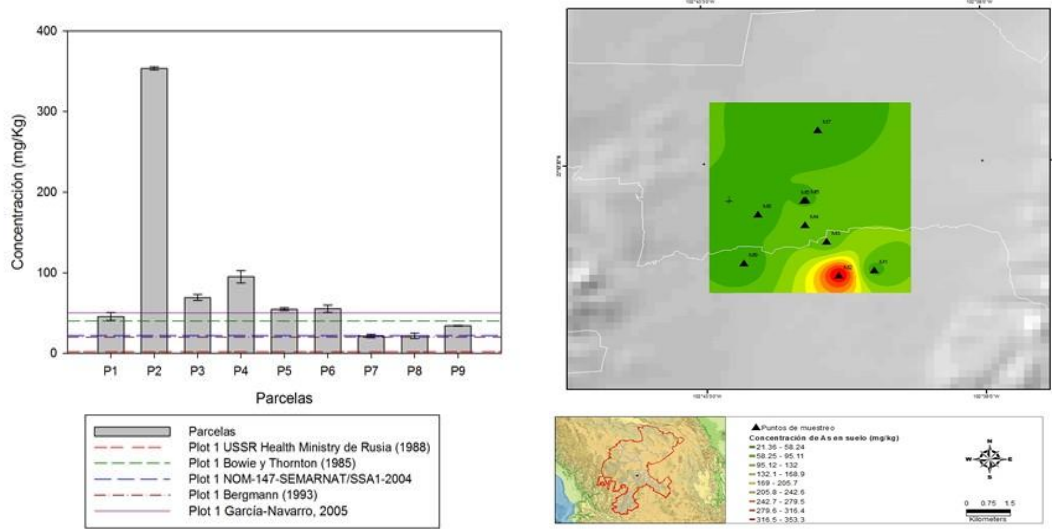


Fig. 2. Análisis de la concentración de As en las muestras de suelo en Morelos, Zacatecas

En suelo se aprecia (Fig. 2.) que la mayor concentración se localiza en el sur del área monitoreada y respecto a la concentración la gran mayoría de las muestras de suelo supera los valores establecidos, o bien se encuentran en el límite permitido.

b) Chile

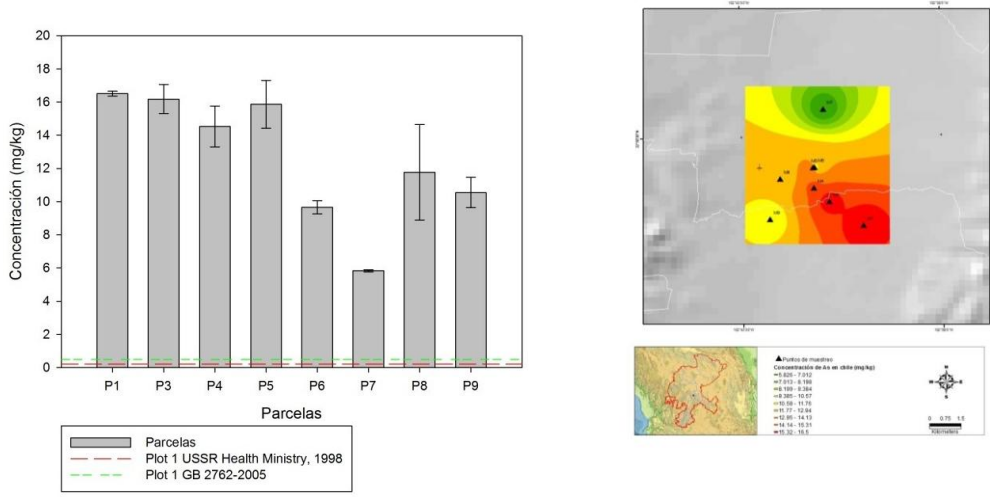


Fig. 3 Análisis de la concentración de Arsénico en las muestras de Chile en Morelos, Zacatecas

En las muestras de Chile se observa (Fig. 3) que los valores medidos son muy superiores que los establecidos por las normas USSR Health Ministry y GB-2762-2005 por lo que se recomienda un monitoreo constante así como actividades de remediación de estas áreas.

c) Raíz

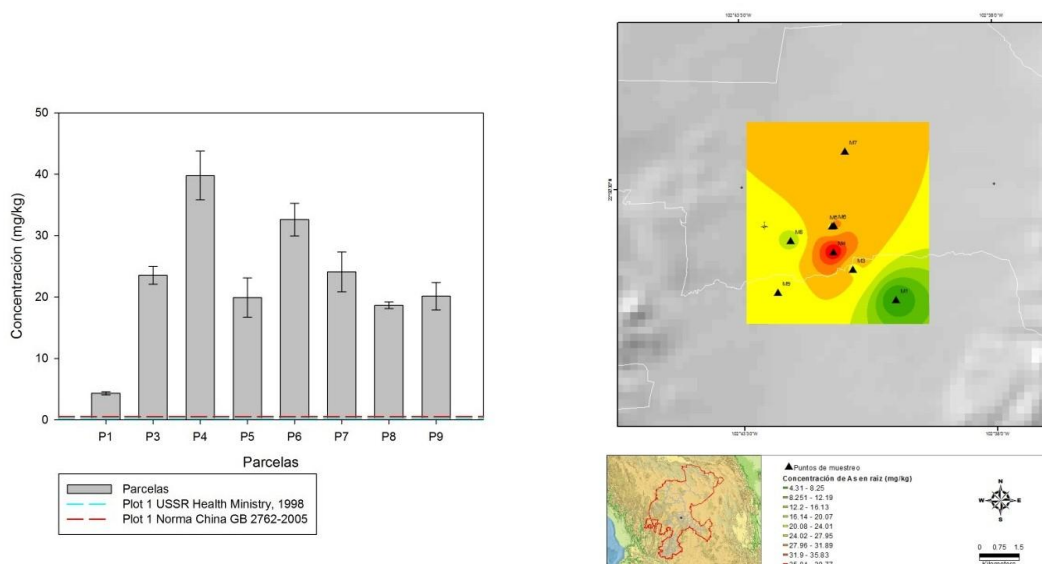


Fig. 4. Análisis de la concentración de As en las muestras de raíz en Morelos, Zacatecas

Los valores de la concentración de As en raíz (Fig. 4) demostraron sean aún más dispares de lo que establece la normativa haciendo inviable su consumo humano.

d) Tallo

De igual manera la fig. 5 se observa que las concentraciones de Arsénico en las muestras de tallo se sitúan muy por encima de los valores establecidos por las normativas vigentes en lo que refiere a alimentos para consumo humano. Se recomienda un seguimiento más continuo de los productos cultivados en las regiones con historial minero.

En general a través del presente estudio pudimos constatar las necesidades de programas de remediación para reincorporar las áreas con historial minero al sector productivo de alimentos básicos.

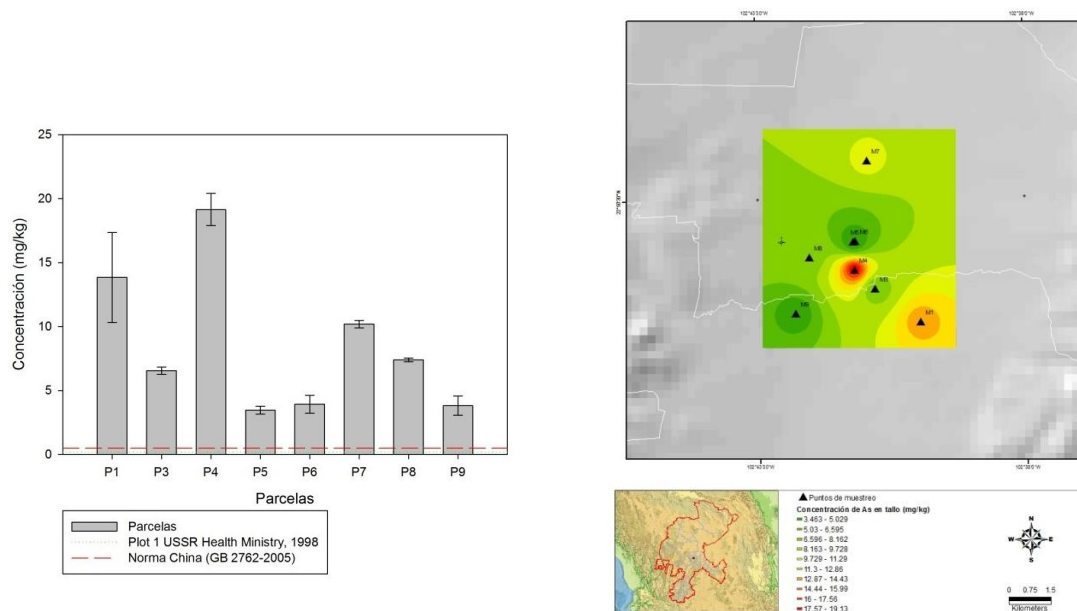


Fig. 5. Análisis de la concentración de As en las muestras de tallo en Morelos, Zacatecas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alloway, B. (1990): Heavy metals in soils. Edited by Blackie and Son, London.
2. Antón, A.; Lizaso, J. (2010): Los metales pesados en la alimentación. With assistance of Fundación Ibérica para la seguridad alimentaria. Available online at <http://www.fundisa.org/articulod/fmetales.pdf>.
3. Arao, T.; Ishikawa, S.; Murakami, M.; Abe, K.; Maejima, Y.; Makino, T. (2010): Heavy metal contamination of agricultural soil and countermeasures in Japan. In Paddy and Water Environment 8 (3), pp. 247–257.
4. ATSDR (2007): CERCLA Priority List of Hazardous Substances 2005. Edited by Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Department of Health and Human Services. Available online at <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>.
5. Barbour, (1994): Mining non-ferrous metals. In: Mining and its environmental impact. In Issues in Environmental Science and Technology, Royal Soc. of Chem., pp. 1–15.
6. Bergmann, W. (1993). Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Alemania.
7. Bowie, S.H.U. e I. Thornton (eds.). (1985). Environmental geochemistry and health. D. Reidel Publishing Company, Lancaster, PA
8. Carbonell-Barrachina, A.; Signes-Pastor, A.J.; Vazquez-Araffjo, L.; Burlo, F.; Sengupta, B. (2009): Presence of arsenic in agricultural products from arsenic-endemic areas and strategies to reduce arsenic intake in rural villages. In Mol. Nutr. Food Res 53, pp. 531–541.
9. Cubadda, F.; Ciardullo, S.; D'Amato, M.; Raggi, A.; Aureli, F., Carcea, M. (2010): Arsenic contamination of the environment-food chain: a survey on wheat as a test plant to investigate phytoavailable arsenic in Italian agricultural soils and as a source of inorganic arsenic in the diet. In Journal Agriculture, Food and Chemistry 58 (18), pp. 10176–10183. DOI: 10.1021/jf102084p.
10. Cui, Y.j.; Zhu, Y.G.; Chen, D.Y.; Huang, Y.Z.; Qiu, Y.; Liang, J.Z. (2004): Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China. In Environment International 30 (6), pp. 785–791.

11. D'Amore, J. J.; Al-Abed, S. R.; Scheckel, K. G.; Rya, J. A. (2005): Methods for speciation of metals in soils: A review. In *Environmental Quality* 34, pp. 1707–1745.
12. De Haan, F. A. M.; Zwerman, P. J. (1978): Pollution of Soil. In Elsevier Science, pp. 192–271.
13. De la Vega, S. (2008): Crecimiento urbano en la ciudad de Zacatecas y sus asentamientos en zonas mineralizas polimetálicas. In *Revista Mexicana de ciencias geológicas* 11, pp. 106–112.
14. Fabietti, G.; Biasioli, M.; Barberis, R.; Ajmone-Marsan, F. (2010): Soil contamination by organic and inorganic pollutants at the regional scale: the case of Piedmont, Italy. In *Journal of soils and sediments* 10 (2), pp. 290–300.
15. FAO (2008): Food and Agricultural commodities production. Available online at <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
16. Garcia-Navarro, A. 2003. Gestion y conservacion del suelo. Leccion 4. Contaminacion del suelo. Contaminantes especificos. Metales pesados. Departamento de Biología y Produccion de los Vegetales, Universidad de Extremadura, Badajoz, Espana.
17. González, Sheila (2015): Determinación y movilidad de metales tóxicos en residuos del proceso de recuperación de restos mineros (jales) de Zacatecas (México). Edited by Universidad de Valladolid. España.
18. Herawati, N.; Susuki, S.; Hayashi, K.; Rivai, I.F.; Koyama, H. (2000): Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 64, pp. 33–39.
19. Herrera, Daniel (2013): Estudio de la concentración de Pb y radiación g natural en suelos y Capsicum frutescens L. (chile de árbol).
20. Kabala, C.; Singh, B. R. (2001): Fractionation and mobility of copper, lead, and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. In *Journal Environmental Quality* (30), pp. 485–492.
21. Mandal, B.K.; Suzuky, K.T. (2002): Arsenic round the world: a review. In *Talanta* 58 (1), pp. 201–235.
22. Mohammad, A.H.; Bhuiyana, B.; Lutfar Parvezb, M.A.; Islamc, Samuel B.; Dampared, Shigeyuki Suzukia (2010): Heavy metal pollution of coal mine-affected agricultural soils in the northern part of Bangladesh. In *Journal of hazardous materials* 173 (1), pp. 384–392
23. Patil, Usha N. (2012): Environmental Air Pollution and its Harmful Effects a Study in Indian Context. In *Indian Streams Research Journal* 2 (10).
24. Pérez, Ester (2015): Caracterización y fraccionamiento químico de metales tóxicos en residuos mineros. Edited by Universidad de Valladolid. España.
25. Santos-Santos, Elvira; Yarto, Mario; Gavilán, Irma, Castro, José; Gavilán, Arturo (2006): Analysis of Arsenic, Lead and Mercury in Farming Areas with Mining Contaminated Soils at Zacatecas, Mexico. Edited by Sociedad Química de México. Universidad Nacional Autónoma de México.
26. SIAP (2009): El chile. Available online at www.siap.gob.mx
27. Smith, N.; Alston, A. (1998): Arsenic in the soil environment: a review. In *Adv. Agron* 64, pp. 149–195.
28. Tiwari, K. K.; Singh, N. K.; Patel, M. P.; Tiwari; Rai, U. N. (2011): Metal contamination of soil and translocation in vegetables growing under industrial wastewater irrigated agricultural field of Vadodara, Gujarat, India. In *Ecotoxicology Environmental Safety* 74 (6), pp. 1670–1677.
29. Tomohito, Arao; Satoru, Ishikawa; Masaharu, Murakami; Kaoru, Abe.; Yuji, Maehima; Tomoyuki, Makino (2010): Heavy metal contamination of agricultural soil and countermeasures in Japan. In *Paddy and Water Environment* 8 (3), pp. 247–257.
30. VIVO, B. de; BOVE, M.A.; LIMA, A.; ALBANESE, S.; CICCHELLA, D.; GREZZI, G. et al. (2009): Atlas geoquímico ambiental de Italia.

CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN DE HALO DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

Ixchel Abby Ortiz-Sánchez* Michell Viridiana González-Campos, Gladys Valeria Gutiérrez-Medrano, Sonia Valdez-Ortega, Erika Cecilia Gamero-Posada, Mirka Maily Acevedo-Romero

Instituto Tecnológico Del Valle Del Guadiana. sonia_valdez@hotmail.com

RESUMEN

México se encuentra en la quinta posición de productores de frijol a nivel mundial destacando Durango, como el estado de mayor producción. La principal problemática es la enfermedad del tizón de halo, inducido por la bacteria *Pseudomonas Syringae* la cual provoca manchas circulares, con el centro necrosado rodeado por un halo amarillento verdoso ocasionando bajos rendimientos y semilla de mala calidad. Se ha estudiado si los extractos de aceite presentan la propiedad de inhibir el crecimiento de microorganismos, actuando como agentes bacteriostáticos o antifúngicos. El objetivo del trabajo fue evaluar la efectividad de la aplicación de extractos de Cuminum cyminum sobre el crecimiento de *Pseudomonas syringae* aisladas de frijol variedad Pinto Saltillo. Las semillas se infectaron con la bacteria, y se realizó la siembra en charolas, para después trasplantarse en macetas. Se realizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 5*7 donde el Factor A fueron dosis de extracto de comino (4, 6 y 8 mL), un testigo negativo (Agua) y testigo positivo (hipoclorito de sodio al 5%), el Factor B fueron los días después de la siembra (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días). Las variables dependientes fueron: altura de planta y presencia de bacteria. Los resultados indican que si hay diferencias significativas entre los tratamientos, siendo cada dosis igual de efectiva que el hipoclorito de sodio; lo que significa que el uso de extractos se puede usar como una alternativa sustentable orgánica y sustituir los plaguicidas químicos.

INTRODUCCIÓN

México se encuentra en la quinta posición de productores de frijol a nivel mundial destacando en su producción los estados de Zacatecas, Chihuahua y Durango (Ávila, et al., 2011). En Durango se siembra el 15 % de la superficie nacional cultivada con esta leguminosa y se obtiene el 13 % del grano producido a nivel nacional. En esta entidad, la superficie promedio anual sembrada con frijol en 2017 fue 245 mil hectáreas y se produjeron 128 mil toneladas de grano (INFOSIAP, 2018). Este cultivo es afectado por diversos factores abióticos y bióticos que limitan su producción. Entre los factores bióticos se encuentran las enfermedades causadas por diferentes agentes entre los que se encuentran bacterias, virus, nematodos y hongos. Tal es el caso del tizón de halo, inducido por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*, generalmente ésta es la primera enfermedad foliar que se observa en los cultivos de temporal; la cual provoca la defoliación prematura de las plantas y puede llegar a causar la muerte de plantas jóvenes de variedades; las semillas que alcanzan su desarrollo y están infectadas pueden transmitir a *P. syringae* pv. *Phaseolicola*, al siguiente ciclo (Prudencio et al., 2008). Los productores consideran que la fertilización, control de maleza, plagas y enfermedades frecuentemente son efectuados de manera ineficiente por la carencia de recursos y el alto costo que implica su realización. Una alternativa a esta problemática es el uso de extractos de plantas aromáticas las cuales se han utilizado desde hace mucho tiempo para obtener aromas y sabores. En la actualidad se han estudiado los extractos y aceites esenciales de condimentos y especias desde un punto de vista funcional, ya que son usados como antioxidantes, portadores de nutrimentos y antimicrobianos actuando como agentes bacteriostáticos o antifúngicos (Peredo et al., 2009). Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de la aplicación de extractos de *Cuminum cyminum* sobre el crecimiento de *Pseudomonas syringae* en frijol variedad Pinto Saltillo en invernadero.

TEORÍA

El estado de Durango es una de las principales entidades productoras de frijol en México. El cultivo del frijol se encuentra entre los principales productos básicos de la alimentación del pueblo mexicano, ocupando el segundo lugar en superficie cultivada, después del maíz (Sánchez et al., 2001). La clase comercial de grano pinto es la que se siembra en una mayor superficie, seguida de otros tipos de grano como son negro, canario (garbancillo) y flor de mayo (Rosales et al., 2009). Por su importancia,

el frijol es considerado por los productores como un cultivo que le proporciona alimento y beneficios económicos, lo que a su vez contribuye al mejoramiento del nivel de vida de la población duranguense. La rentabilidad promedio registrada se situó entre 1.2 y 1.7, lo cual significa que se obtiene una ganancia de 20 a 70 centavos, por cada peso invertido en la producción de frijol (Pajarito, 2015). Actualmente, se requieren procesos sustentables que agreguen valor a la producción de frijol, lo cual incrementará los beneficios económicos obtenidos por los agricultores y la cantidad de divisas ingresadas al estado de Durango.

La incidencia de las enfermedades en el cultivo de frijol es uno de los principales factores que disminuye la producción entre el 23 y 43 %, la calidad y las ganancias al productor. Una de las enfermedades de importancia económica mayor es el tizón de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) (Rosales et al., 2009). El tizón de halo se desarrolla con temperaturas de 16 a 20 °C, humedad relativa alta (> 80%), lluvia y rocío (Prudencio et al., 2008), provoca manchas circulares, con el centro necrosado rodeado por un halo amarillento verdoso. Posteriormente el área necrótica se rasga y cae, si las condiciones son favorables hay defoliación. La enfermedad puede desarrollarse de manera sistémica, los brotes nuevos muestran clorosis y la planta es de menor tamaño que las plantas sanas. En las vainas se forman manchas circulares de aspecto grasoso, con exudados color crema cuando hay humedad relativa alta, al secarse dejan una lesión café rojiza (Rudolph, 1984; Schwartz, 1989). La bacteria puede causar el aborto de semillas, dejarlas enjutas o causar su muerte. Las semillas que alcanzan su desarrollo y están infectadas pueden transmitir a *P. syringae* pv. *phaseolicola*, con lo que facilitan su dispersión al siguiente ciclo (Saettler et al., 1991). El Control químico ha tratado de erradicar las bacterias que pueden encontrarse en la semilla antes de la siembra, pero estas medidas de control no han tenido mucho éxito, debido a que las bacterias en la semilla están protegidas por la cutícula, de manera que los métodos más usuales de tratamientos no son efectivos contra ellas, únicamente con tratamientos más largos, los cuales dañan considerablemente la germinación.

En los últimos años la sociedad ha priorizado los aspectos ambientales y ha dirigido un importante número de investigaciones hacia el hallazgo y establecimiento de nuevas alternativas para el manejo integrado de plagas y enfermedades de las plantas con menos efectos negativos al ambiente (Vaillant et al., 2009). Los aceites esenciales y extractos de plantas han demostrado su efectividad antimicrobiana contra agentes fitopatógenos. Tal es el caso del cultivo de comino (*Cuminum cyminum* L.) es una planta herbácea anual pequeña, cuyos tallos erectos alcanzan entre 15 y 50 cm de altura. La planta posee hojas filiformes, alternas, de entre 5 y 10 cm y flores de color blanco o rosado dispuestas en umbelas pequeñas; los frutos son diaquenios ovoides de 4-5 mm de longitud, con los mericarpos de sección semielíptica y con una semilla en su interior. El sabor y el olor son intensos. Se emplean los frutos y las semillas. Los frutos de comino contienen aceite esencial (2.5-4%) en el que se han aislado e identificado más de 60 componentes diferentes (monoterpenos, sesquiterpenos, aldehídos y óxidos aromáticos), siendo el principal el aldehídocumínico o cuminal acompañado de safranal y en menor proporción monoterpenos como pineno y terpineol. Se han aislado además glucósidos de lactonas sesquiterpénicas (cuminósidos), flavonoides, esteroides, etc. La composición del aceite esencial puede variar dependiendo de diversos factores como el origen geográfico, momento de recolección, etc. (Carretero, 2010).

PARTE EXPERIMENTAL

Área de estudio.

El trabajo se estableció en las Instalaciones del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, situado en el kilómetro 22.5 de la carretera México-Durango a 24°01'00' Latitud Norte, 104°40'00" Longitud Oeste, elevación 1860 m. En el Ejido de Villa Montemorelos Durango y en el invernadero del Campo Experimental Valle del Guadiana del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias situado en el kilómetro 4.5 de la carretera Durango-Mezquital a 23°59'23.23' Latitud Norte, 104°37'26.21' Longitud Oeste, elevación 1879 m.



Figura 1. Ubicación geográfica del INIFAP



Figura 2. Ubicación geográfica del ITVG

Aislamiento de cepa nativa de Tizón de Halo.

La cepa utilizada en este trabajo fue aislada de semillas de frijol Pinto Saltillo que fue producida en el municipio de Panuco de Coronado, Durango en 2017, que presentaba signos claros de tizón de halo. Muestras de 10 g de semilla fueron selladas en la región hilar utilizando pegamento a base de cianoacrilato. Las semillas se desinfectaron usando una solución de hipoclorito de sodio al 2%, en agitación constante durante 3 min y luego enjuagadas con agua destilada estéril. En condiciones asépticas, las semillas secas fueron molidas en 90 mL de buffer de fosfatos en una licuadora doméstica durante 1 min, para liberar al patógeno de los tejidos de la semilla. La bacteria se aisló por medio de diluciones seriadas decimales, que luego fueron sembradas sobre B-King por la técnica de extensión en superficie. La incubación se llevó a cabo a 30°C por 48 h. Los aislados fueron confirmados considerando la morfología colonial, morfología microscópica, metabolismo y una curva de crecimiento por espectrofotometría a 660nm. Posteriormente, la bacteria se creció sobre agar nutritivo por la técnica de agotamiento y se cosechó raspando el medio con una varilla de vidrio en "L" y buffer de fosfatos, la suspensión bacteriana se colocó dentro de un tubo estéril con tapa.

Producción del extracto de Comino.

Para la obtención del extracto de comino se utilizó la técnica de arrastre por vapor, la cual consistió en colocar 50 gr de material seco en un matraz de destilación con 750 mL de agua, se tapó el matraz con un tapón de hule para evitar pérdida de vapor. Se conectó el matraz de destilación a un condensador con un tapón de hule horadado cerciorándose que no hubiera fugas de vapor, y con la corriente de agua de abajo hacia arriba. Con un mechero o una placa calefactora se calentó la mezcla hasta ebullición con el fin de generar vapor, recuperando de esta manera el extracto. Se suspendió el calentamiento cuando empezó a verse la mezcla deshidratada. Enseguida se colocó el extracto en un matraz de separación, obteniendo así el aceite esencial y el extracto acuoso. A la fase líquida restante en el matraz de destilación se le denominó infusión. Se preparó un té de la planta, poniendo en un matraz Erlenmeyer 10 gr de planta triturada con 250 mL agua destilada, se llevó a ebullición por 10 min y se filtró. Todos los extractos obtenidos se colocaron en frascos ámbar y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. El material vegetal utilizado durante el experimento fue obtenido comercialmente en la ciudad de Durango, Dgo.

Área experimental y distribución de tratamientos.

El área experimental estuvo conformada por 18 macetas, donde la unidad experimental fue cada maceta. El diseño experimental que se utilizó fue un completamente al azar con arreglo factorial 5*7, con 3 repeticiones por tratamiento; donde el Factor A fueron dosis de extracto de comino (4, 6 y 8 mL), un testigo negativo (TN= Agua) y testigo positivo (TP=hipoclorito de sodio al 5%) y el Factor B fueron los días después de la siembra (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DDS). Las variables dependientes fueron altura de planta (cm) y presencia y/o ausencia de bacteria.

Manejo Agronómico del cultivo.

Para evaluar la efectividad de cada uno de los tratamientos sobre la inhibición de *P. syringae*, en el cultivo de frijol se infestaron semillas con cepas aisladas utilizando semillas de la misma variedad, que fueron embebidas en una suspensión de *P. syringae*, con una concentración 1×10^6 durante 10 minutos con agitación constante. Las semillas infestadas se dejaron remojando en las diferentes dosis de tratamientos por 30 min. y dejándolo secar por 24 h. Posteriormente se sembraron en macetas a una profundidad de 5 cm utilizando como sustrato pet moss. La aplicación de los tratamientos fue de manera manual y directamente a la planta a los 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DDS. Se realizó una aplicación de fertilización química con la dosis de 35-50-00 (N-P₂O₅-K₂O) a las 10

DDS. En la evaluación de las variables dependientes se llevó un monitoreo durante cada una de las etapas fisiológico del cultivo, para la variable altura se midió dónde empieza el tallo hasta la última hoja; y en el caso en la presencia de bacteria se estuvo registrando presencia o ausencia durante todo el ciclo fisiológico del cultivo.

Análisis estadísticos.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el programa computacional paquete InfoStat y se aplicó la prueba de medias de diferencia mínima significativa (DMS) con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

En la evaluación de la variable dependiente de Presencia de la bacteria *P. syringae*, durante el ciclo fisiológico del cultivo del frijol en los tratamientos de extractos de comino (4, 6 y 8 mL) y del Testigo positivo (TP=hipoclorito de sodio al 5%) no se presentó sintomatología de la bacteria; solo se presentó en el Testigo negativo (TN) donde solo se aplicó agua. La inhibición de la bacteria en el cultivo se debe a que el comino ha demostrado tener potente actividad antimicrobiana sobre diversas especies de bacterias y hongos, tanto patógenos como no patógenos. Los estudios químicos realizados indican que la mayor parte de esta actividad antimicrobiana es debido al cuminaldehído (p-isopropil benzaldehído) presente en el fruto desecado de esta planta (Carretero, 2010).

En el análisis de varianza de los datos obtenidos en la evaluación del efecto de extractos de comino sobre la altura de la planta de frijol, mostró que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos de las dosis de los extractos y testigos, los DDS y la interacción entre ambos. La prueba de diferencia de medias de LSD ($\alpha=0.05$) de los niveles del factor A (dosis de extractos) indica que los tratamientos con dosis de dosis de extracto de comino y el Testigo positivo son estadísticamente iguales y diferentes al Testigo negativo (Figura 3A). Tanto los extractos del comino como el Testigo Positivo mostrarán ser beneficioso en el crecimiento vegetal, lo cual coincide con lo que menciona Weerasena et al. (1993) que algunos extractos vegetales favorecen la producción o el rendimiento de las cosechas.

En el Factor B (DDS) se encontró diferencia significativa entre las semanas de evaluación, resultado la semana 7 (49 DDS) y 6 (42 DDS) estadísticamente iguales y diferente a la semana 5 (35 DDS), 4 (28 DDS), 3 (21 DDS) y 2 (14 DDS) y todas diferentes a la semana 1 (7 DDS); con lo anterior se comprobó que los extractos no inhiben el crecimiento en ninguna de las etapas de desarrollo del cultivo; así mismo se observó que se puede minimizar las aplicaciones de los tratamientos (Figura 3B).

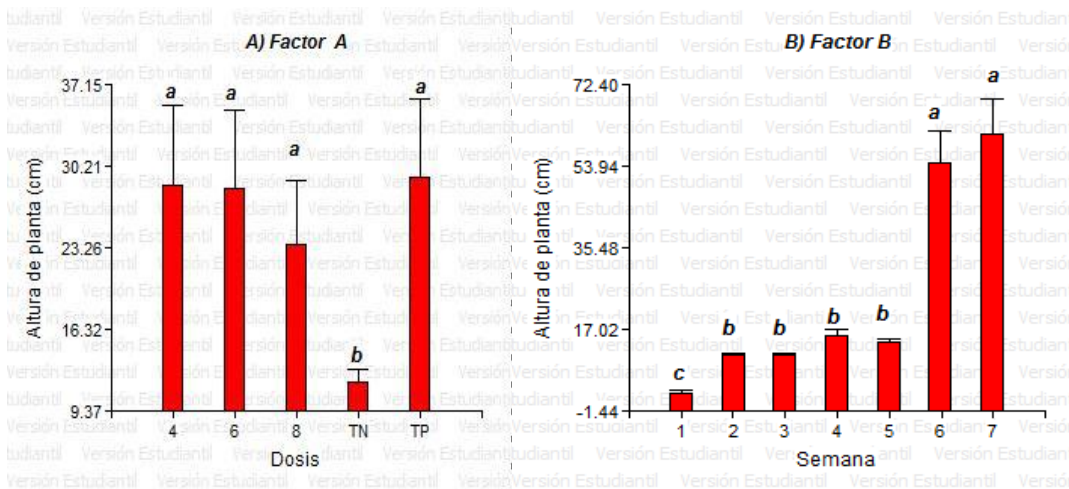


Fig. 3. Comparación de medias del Factor A (Tratamientos) y B (semanas).

†Medias con diferente letra indican diferencia significativa, según la prueba de LSD ($P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

Con este trabajo abre la posibilidad de utilizar productos orgánicos como el extracto de comino, como una opción para sustituir los productos químicos que se aplican al cultivo de frijol cuando se presenta la enfermedad de Tizón de Halo; debido a que provee un control eficiente como agente de control biológico y crecimiento del cultivo de frijol.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ávila Marioní, M., Espinoza Arellano, J., González Ramírez, H., Rosales Serna, R., Pajarito Ravelero, A., & Zandate Hernández, R. 2011. Caracterización de los productores, adopción e impacto económico del uso de la variedad de frijol "Pinto Saltillo" en el norte centro de México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 29, 682-692.
2. Carretero Acame, M.E. 2010. Propiedades terapéuticas del comino. *Panorama actual del Medicamento*, 34 (335) 573-577.
3. INFOSIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por estado. Consultado en línea 06/04/2018. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do
4. Pajarito, R. A. 2015. Frijol. In: *Agenda Técnica Agrícola*. Durango. 2ed. SAGARPA-SENASICA-INIFAP. México, D. F. pp. 63-69.
5. Peredo Luna, H., Palou García, E., & López Malo, A. 2009. Aceites Esenciales: Métodos de Extracción. *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos* 3-1(3), 24-32.
6. Prudencio Sains, J., Navarrete Maya, R., Navarrete Maya, J., & Acosta Gallegos, J. 2008. Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el Valle de México. *Agricultura técnica en México*, 34(2), 201-212.
7. Rosales, S. R., J. A. Acosta G., F. J. Ibarra P., E. I. Cuéllar R. y C. A. Nava B. 2009. Validación de líneas y variedades mejoradas de frijol en Durango. *Publicación Especial Núm. 36. INIFAP-Campo Experimental Valle de Guadiana*. Durango, Méx. 84 p.
8. Rudolph, K. 1984. Multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* "in planta" I: relation between bacterial concentration and water congestion of different bean cultivars and plant species. *Phytopathol. Z.* 111:349-352.
9. Saettler, A. W. 1991. Disease caused by bacteria. In: Hall, R. (ed.). *Compendium of bean diseases*. APS Press. St Paul, MN. p. 29-30.
10. Sánchez R., G., J. A. Manriquez N., F. A. Martínez M. y L. A. López I. 2001. El frijol en México competitividad y oportunidades de desarrollo. *Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Boletín Informativo. Núm. 316, Vol. XXXIII*. México.
11. Schwartz, H. F. 1989. Halo blight. In: *Bean production problems in the tropics*. Schwartz, H. F., and PastorCorrales, M. A. (eds.). CIAT. Cali, Colombia. 654 p.
12. Vaillant FD, Romeu CC, Ramos RE, González GM, Ramírez OR, González PJ. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislados de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.) *Fitosanidad*. 13:197-200.
13. Weerasena O.V.D.S.J., Amarasekara A.S., Wijesundera R.L.C. 1993. "Fungicidal Activity of synthetically modified cashew nut shell liquid" *Journal of Natural Science*, 21(2) pp 253 258.
14. Weber, G. F. 1973. *Bacterial and fungal diseases of plants in the tropics*. L. University of Florida. Gainesville, FL, 673.

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATO OXIDASAS EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA

*Karla Nallely Rivera Hernández., Jacquelin León Báez, María del Sugeyrol Villa Ramírez, Carolina Ramírez López. [*karlanallely@hotmail.com](mailto:karlanallely@hotmail.com)

Instituto Politécnico Nacional - Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala, Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla Km. 1.5 Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, C.P.90700.

RESUMEN

El permeado de suero de leche rico en lactosa es un importante subproducto de la fabricación de quesos en México. Ácido lactobiónico es un producto de bioconversión derivado de la lactosa, que puede ser utilizado como un agente acidificante no calórico, con propiedades aromatizantes de gran valor. Lactobionato se obtiene por oxidasas de hidratos de carbono específicos lactosa, ampliamente presentes en cepas microbianas. El presente estudio consistió en el cribado y selección de cepas de hongos, que pudieron realizar la conversión enzimática de carbohidratos en ácidos orgánicos, por su capacidad para producir y secretar el carbohidrato oxidasa en fermentación sumergida. Las muestras de suelo de diferentes ecosistemas naturales de México, se utilizaron como fuentes de cultivos de hongos filamentosos. Formulaciones de medios Lactosa enriquecidos descritos para el aislamiento de los ascomicetos, se utilizaron como medios semi-selectivos. Más de 130 cepas fueron seleccionados por su capacidad para acidificar un medio de lactosa complejo, usando azul de bromofenol como indicador de pH. Tanto un ensayo colorimétrico se utilizó para el cribado secundario. Siete cepas MWPK-B42, CJ51, CB-5A, H71D, COA-L31, CIL-G31 y TLA-4J se seleccionaron por su capacidad de producir carbohidrato oxidasa como se evidencia por métodos de CCF. El análisis preliminar morfológico y microscópico indica que las cepas positivas pertenecen a la Aspergillaceae o la Fusariaceae. Una cepa seleccionada, MWPK-B42 ha demostrado una mayor producción extracelular de oxidasa de lactosa en fermentación sumergida, utilizando medios líquidos que contienen lactosa como única fuente de carbono.

INTRODUCCIÓN

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía de países industrializados y en desarrollo. Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero el cual retiene cerca de 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. Un mayor porcentaje de este residuo es descartado como efluente provocando serios problemas ambientales, debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo, esto da como resultado la disminución del rendimiento de cultivos agrícolas; cuando se desecha en el agua reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto.

La distribución mundial de la producción de lactosuero es del 53% en Europa, 28% en América del Norte, 6% en Asia, 5% en África, 4% en Oceanía y 4% en América del Sur, anualmente estos porcentajes representan 110-115 millones de L/año de este subproducto de la elaboración principalmente de queso (Almécija, M.C. 2007). Se estima que el 45% de este subproducto se desecha en ríos, lagos y en otros centros de aguas residuales, también en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes y al mismo tiempo ocasiona serios problemas de contaminación. El porcentaje restante es tratado y transformado en varios productos alimenticios, de los cuales cerca del 45% es usado directamente en forma líquida, 30% en polvo, 15% como lactosa y subproductos, y el resto como concentrados de proteína de lactosuero.

Considerables esfuerzos han sido realizados en el pasado para explorar nuevas alternativas para la utilización de lactosuero y con ello disminuir la contaminación ambiental. Entre los productos de exitosa aceptación se encuentran las bebidas refrescantes, bebidas fermentadas y alcohólicas, biopelículas, producción de ácidos orgánicos, concentrados de proteínas, derivados de lactosa entre otros debido a sus bajos costos de producción, grado de calidad alimenticia y aceptable sabor.

Microorganismos como *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* y *P. amagasakiense* son capaces de producir GOx, y en concentraciones más bajas esta *Penicillium variabile* (Petruccioli et al.; 1993), *Phanerochaete chrysosporium* (Kelly et al.; 1986), *Talaromyces flavus* (Kim et al., 1990), *Penicillium*

expansum. Por lo tanto, se tiene un gran interés en el aislamiento de hongos filamentosos que produzcan GOx a partir de lactosa, para la conversión de nuevos productos con valor agregado en la industria alimentaria.

METODOLOGÍA

Recolección de muestras

Las muestras de suelo se recolectaron en la Sierra Nororiental del estado de Puebla, en el sur del estado de Tlaxcala y zona cafetalera del estado de Veracruz, las cuales se conservaron en bolsas de polipapel etiquetadas y se guardaron a 4 °C hasta su utilización.

Aislamiento de hongos en medios selectivos

Lavado de la muestra. Se pesaron 10 g de cada muestra de suelo y se colocaron en matraces erlenmeyer de 1L. En campana de flujo laminar se adicionaron 90 ml de medio de sales minerales definido por Mandel y Weber (1969) estéril. La muestra se incubó en un agitador orbital a 100 rpm durante 1 h.

Técnica de dilución en placa. Esta técnica se utilizó para cuantificar los microorganismos en placa de cultivo realizando diluciones del suelo. Se utilizó 1 ml de la muestra homogenizada en medio de sales minerales se mezcló con 9 ml de agua destilada en tubos de ensayo en condiciones estériles, y se realizaron diluciones seriadas, las cuales se agitaron por 1 minuto, para luego realizar la siembra masiva en superficie (100 µl de muestra diluida) en medios de cultivo selectivos: para el género *Fusarium* se utilizó el medio Medio de Nash and Snyder (1965) y el género *Mucor* medio de Mandels y Sternburg modificado (Fawzi 2010). Posteriormente se incubaron de 3 a 10 días a temperatura ambiente, 28 +/- y 45° C para observar el crecimiento de colonias de hongos. Los aislamientos se purificaron por resiembra en placas de PDA.

Determinación de actividad enzimática de carbohidratos oxidasas en placa.

Se realizó un escrutinio primario para la selección de cepas productoras de lactosa oxidasa (LacOX) y glucosa oxidasa (GOX) con azul de bromofenol con concentración 0.01 % (p/v), contenido en el medio sólido, el cual se formuló con diferentes fuentes de carbono (glucosa, lactosa y almidón). Las placas se incubaron y se observó cada 24 h la presencia de decoloración en el medio (Saúl Alonso et al.; 2011).

Fermentación líquida.

Se inocularon matraces, los cuales contenían un volumen de trabajo de 500 ml de medio de lactosa modificado con una concentración de esporas de 1×10^8 UFC/ml, los cultivos se colocaron en un agitador orbital a 150 rpm y se incubaron a 28 +/- °C, sacrificando un matraz y duplicado cada 24, 48 y 72 días por el periodo de la fermentación analizar. El cultivo líquido se microfiltró en membranas millipore de 0.22 µm y transfirió el microfiltrado a un ultrafiltrador marca millipore con una membrana de polietilensulfona de tamaño de exclusión de 10 kDa.

Actividad enzimática por colorimetría para la determinación de lactosa oxidasa

La actividad se determinó a 40°C durante un tiempo de incubación de 0, 4, 8 y 24 h, la mezcla de reacción contiene 500 µL de sobrenadante, 500 µL de buffer de fosfatos 0.2 mM pH 6.5, 500 µL de agua destilada, 500 µL de reactivo peroxidase horseradisch - o-dianisidina y 500 µL de solución de lactosa (1%). Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción enzimática se detuvo con 2ml de HCl 6N y se observó la coloración (purpura-rosa).

Determinación de ácido lactobionico por cromatografía en capa fina (tlc).

Para la determinación de productos de reacción en cromatografía de capa fina (TLC), se llevó por un método de reacción enzimática donde actividad enzimática se determinó a 40°C durante un tiempo de reacción de 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h.; la mezcla de reacción contiene 500 µl de sobrenadante ultrafiltrado, 500 µl de buffer de fosfatos 100 mM pH 6.5, 500 µl de agua destilada y 500 µl de solución de lactosa (5%). Después del tiempo de incubación, los productos de reacción fueron revelados a través de una placa de sílica gel usando *n-butanol- ácido acético- agua* (2:1:0.8, v/v) como disolvente, se reveló con H₂SO₄ – Metanol (10%), se detectaron mediante el calentamiento de la placa 110-120°.

RESULTADOS

Aislamiento de hongos filamentosos en medios selectivos.

Los medios fueron formulados con solo dos fuentes de carbono glucosa y lactosa. En la tabla 1 se presentan los resultados del número total de los aislamientos en las 3 muestras de suelos colectadas en diferentes zonas de muestreo. Las colonias de hongos que crecieron en los medios solidos se representan en UFC por gramo de suelo (UFC/g), dando un total de 106 aislamientos que crecieron en 30°C y 32 aislamientos que crecieron en 45°C. Estos aislamientos se realizaron a partir de la dilución 1×10^3 - 1×10^6 .

Tabla 1. Número de total de colonias de hongos obtenidos en medios de cultivo selectivos.

Medios de cultivo	No. de aislamientos
Medio general PDA	23
Medio selectivo para Mucorales (Schneider, Keiblinger)	26
Medio selectivo Fusarium (Nash and Snyder)	41
Medio enriquecido con Glucosa	28
Medio enriquecido con Lactosa	20

El efecto del medio de plaqueo tuvo un claro efecto sobre el número de morfotipos coloniales recuperados. El medio de Nash and Snyder fue el más efectivo en la recuperación de diferentes morfotipos de hongos filamentosos ya que la fuente de nitrógeno es mayor comparada con los otros medios, ya que el nitrógeno es importante para realizar la biosíntesis de proteínas, carbohidratos al igual que la fuente de carbono contenida en el medio. Según Mayea et al.; en 1991, Giri et al.; en el 2005 reportaron que la mayor diversidad de hongos filamentosos en suelo se encuentran *Fusarium*, *Aspergillus-Penicillium* y *Mucorales* entre otros.

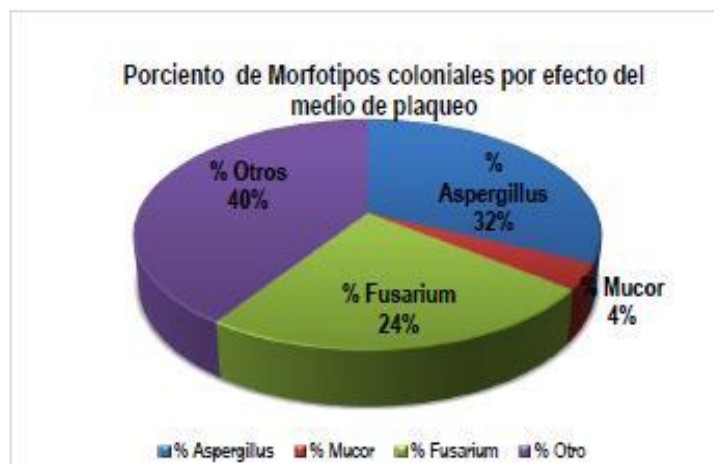


Fig. 1 Efecto del medio de plaqueo sobre el porcentaje de morfotipos coloniales totales cultivados a partir de muestras de suelos.

Determinación de actividad de carbohidrato oxidasa en placa

Con el objeto de detectar de manera cualitativa la presencia de carbohidrato oxidasa en los cultivos de hongos filamentosos aislados, se adaptó un método de detección de cepas que acidifican en placa en presencia de lactosa y glucosa, esto permitió distinguir las cepas que son incapaces de producir ácido en cortos tiempos de crecimiento contra aquellas que si son capaces de producir ácidos.

Los resultados de la evaluación de 138 cepas en el escrutinio primario de decoloración de azul de bromofenol permitieron la selección de 20 cepas, mismas que presentaron muy buena actividad decoloradora en placas con glucosa. Dentro de esas 20 cepas, 7 cepas de hongos filamentosos

(*MWPK-B42*, *CJ51*, *CB-5A*, *H71D*, *COA-L31*, *CIL-G31* y *TLA-4J*) presentaron actividad decolorativa en medio de lactosa.

Este enfoque ha permitido la distinción entre la fase de crecimiento celular durante las primeras 24 h., estos resultados proporcionan la idea que dichas cepas de hongos pueden oxidar la fuente de carbono presente en el medio como se muestra en la tabla 2.

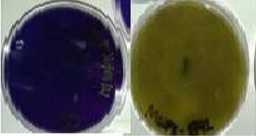


Nombre de la cepa	Actividad LacOX en placa
MWPK-B42	
TLA-4J	
CB-5A	

Tabla 2. Actividad de decoloración de azul de bromofenol en placas de lactosa, a las 24 horas por cepas seleccionadas (Temperatura de incubación de 30°C).

Tres cepas de hongos filamentosos *MWPK-B42*; *TLA-4J* y *CB-5A*, demostraron rápida actividad acidificante en placas con medio de lactosa, en presencia de azul de bromofenol. Por lo tanto, se estudiaron en escrutinios posteriores para demostrar oxidación de lactosa.

Fermentación líquida para producción de lactosa oxidasa.

Tres cepas *MWPK-B42*, *CB-5A* y *TLA-4J* seleccionadas por su actividad de decoloración de azul de bromofenol, se utilizaron en los estudios de producción de lactosa oxidasa.

Para la producción de enzima, se cultivaron las cepas *MWPK-B42*, *CB-5A* y *TLA-4J* en matraces de 2.5 L, con un volumen de trabajo de 500 ml de medio de lactosa. Los cultivos se incubaron a 24, 48 y 72 h., se separó la biomasa y el sobrenadante mediante un sistema de filtración. El sobrenadante fue microfiltrado con membranas millipore de 0.22 μm y posteriormente se ultrafiltró con una membrana de 10 kDa, permitiendo retener y concentrar la enzima contenida en el sobrenadante obtenido de la microfiltración.

Actividad de lactosa oxidasa por colorimetría.

Para el análisis de la actividad enzimática se utilizaron los sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de fermentación de 48 h. La mezcla de reacción para producción de lactosa oxidasa se mantuvo por 8 h. En la figura 2a se ilustra el resultado del ensayo enzimático del sobrenadante obtenido en la fermentación líquida de la cepa aislada *MWPK-B42*. En la figura 12a se puede observar que a un tiempo de reacción de 8 h esta cepa presenta una mayor intensidad de coloración y por lo tanto se consideró como una cepa productora de carbohidrato oxidasa, lo cual se comprobó con la adición de un cromógeno como o-dianisidina, con este método se generó de manera positiva los productos de oxidación, el cual este método es utilizable para el aislamiento y selección de microorganismos capaces de producir enzimas oxidativas.

En la figura 2b se puede observar que para la cepa *CB-5A* el mismo tipo de determinación de actividad enzimática resulta en una coloración menos intensa que la cepa *MWPK-B42*. La figura 2c ilustra el resultado de la reacción utilizando sobrenadante de la cepa *TLA-4J*.

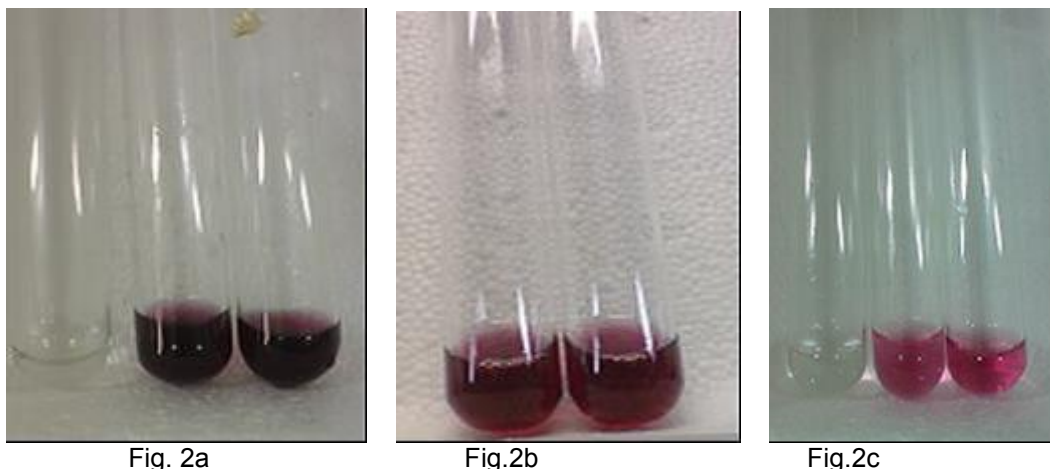


Fig.2 Determinación de actividad enzimática de lactosa oxidasa por aparición color purpura, donde 2a.- mezcla de reacción de MWPK-B42, 2b.- mezcla de reacción de CB-5A y 2c- mezcla de reacción de TLA-4J.

Los resultados de la figura 12 revelan que la mayor actividad enzimática de lactosa por análisis colorímetro basados en la reacción de o-dianisidina se presenta en sobrenadante microfiltrados y ultrafiltrados de la cepa *MWPK-B42*.

Determinación de estándares de lactosa y ácido lactobiónico por cromatografía en capa fina (tlc)

El método de cromatografía de capa fina (TLC) permitió la separación exitosa de los estándares de lactosa y ácido lactobiónico, lo que permitió detectar y estimar cuantitativamente la presencia de ácido lactobiónico en los productos de reacción enzimática.

Se estandarizaron métodos para la cromatografía de capa fina, donde se realizó en una placa de sílica gel en vidrio utilizando una fase móvil con un sistema de solventes n-butanol- Ácido Acético-Agua (2:1:0.8) mismo que fue modificado para una mejor separación de los compuestos (Ludwig et al. 2004). La placa se reveló mediante el uso de aspersión de ácido sulfúrico-metanol al 10%. Una vez revelados los puntos interés se generan manchas circulares correspondientes a cada compuesto.

La figura 3 se presenta un cromatograma típico que contiene los estándares de los estándares de lactosa, ácido lactobiónico y una mezcla de los mismos. En dicho análisis se inyectó 1 μ L de una solución de lactosa (10 mg/ml); 1 μ L de ácido lactobiónico (30 mg/ml); y 1 μ L de la mezcla de ambos compuestos. Una vez desarrollada la cromatografía y tratada la placa para revelación el aspecto del cromatograma es el que se presenta en la figura 3.

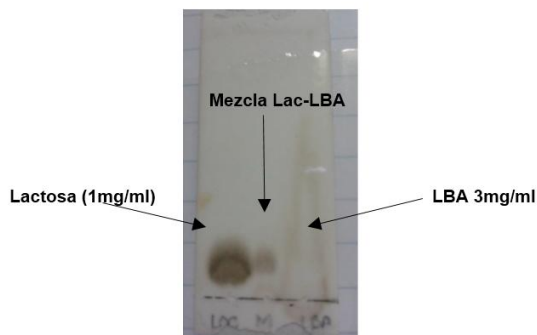


Fig. 3. Cromatograma desarrollado para cromatografía de capa fina para lactosa y ácido lactobiónico

CONCLUSIONES

La Tecnología de Enzimas, constituye una de las áreas de mayor importancia de la Biotecnología. Una enzima que destaca en importancia económica por su gran aplicación en la industria alimenticia es la lactosa oxidasa, su producción y uso hace posible la conversión de lactosa, un disacárido de baja digestibilidad, y residual de la producción de quesos, en ácido lactobiónico, un ácido de gran valor en alimentos y bebidas.

Mediante un sistema de decoloración en placa de azul de bromofenol, fue posible seleccionar 3 cepas potencialmente productoras de carbohidrato oxidasas. De manera relevante, se seleccionaron las cepas *MWPK-B42*, *CB-5A* y *TLA-4J*. Dichas cepas presentaron decoloración de azul de bromofenol medio de lactosa, de estas cepas antes mencionadas 3 tienen una muy buena actividad acidificante en lactosa, por lo cual se estudiaron en escrutinios posteriores para el análisis de lactosa oxidasa en fermentaciones en medio líquido.

Lo cual se comprobó con la adición de un cromógeno como o-dianisidina, con este método se generó de manera positiva los productos de oxidación, el cual este método es utilizable para el aislamiento y selección de microorganismos capaces de producir enzimas oxidativas.

Se adaptó tecnología de screening y selección en placa, en cromatografía de capa fina, que permitió la selección de cepas productoras de lactosa oxidasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad SK, Brinch DS, Friis EP, Pedersen PB; 2004. Pedersen Toxicological studies on Lactose Oxidase from *Microdochium nivale* expressed in *Fusarium venenatum*. *Regul Toxicol Pharmacology*.39 (3):256-70.
2. Almécija, M.C. 2007. Obtención de la lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero.
3. Alonso S, Rendueles M, Díaz M; 2011. Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. *Bioresource Technology*. 102: 9730-9736.
4. Alonso S, Rendueles M; 2012. Physiological heterogeneity of *Pseudomonas taetrolens* during lactobionic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 96(6):1465-77.
5. Alonso S, Rendueles M, Díaz M; 2013. Selection method of pH conditions to establish *Pseudomonas taetrolens* physiological states and lactobionic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97:3843–3854.
6. Finkelstein, D. B. 1987. Improvement of enzyme production in *Aspergillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 53(5): 349–352.
7. Kirk, Raymond, *Enciclopedia de Tecnología Química*, Tomo VI, primera Edición, Editorial Uteha, España 1962.
8. Koutinas, A., H. Papapostolou, D. Dimitrellou, N. Kopsahelis, E. Katechaki, A. Bekatorou and L. Bosnea. 2009. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresour Technology*. 100(15):3734-9.
9. Nash, Shirley M, W.C Snyder, 1965. Quantitative and Qualitative comparisons of *Fusarium* populations in cultivate fields and noncultivated parent soils. *Can.J. Bot*. 43:939-945.
10. Panesar, P., J. Kennedy, D. Gandhi and K. Bunko. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105: 1–14.
11. Peter J. Simms, Kevin B. Hicks, Rebecca M., Haines, Arland T. Hotchkiss Jr., Stanley F. Osman. 1994. Separation of lactose, lactobionic acid and lactobionolactone by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 667: 67-73.
12. Sicard, P. 1989. Amylase production in submerged culture using principal component analysis. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 68 (5):339-343.
13. Thomas Maischberger, Thu-Ha Nguyen, Prakrit Sukyai, Roman Kittl, Sergio Riva, Roland Ludwiga, and Dietmar Haltrich; 2008. Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. *Carbohydrate Research on ScienceDirect*. 343 (12): 2140-2147.

MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE NOPAL CULTIVAR VILLANUEVA (*Opuntia ficus-indica*)

Ma. del Carmen Ojeda Zacarías^{1*} Rigoberto E. Vázquez Alvarado¹; Alejandro Ibarra López¹, Gilberto Rodríguez Pérez².

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, ²Instituto Tecnológico de Roque. Email de contacto: maria.ojedazc@uanl.edu.mx

RESUMEN

En diversidad de cactáceas, México ocupa el primer lugar, las cuales juegan un papel muy importante. En zonas áridas y semiáridas del mundo se utilizan ampliamente como forraje de emergencia en épocas de sequías. Esta situación es alarmante por lo que, es necesario establecer técnicas de propagación que permitan incrementar el material vegetal, ajustando protocolos de regeneración para cada especie por individual. La multiplicación de brotes se originó a través de la activación de areolas del cultivar Villanueva (*Opuntia ficus-indica*), logrando establecer los explantes en medio de cultivo MS más 3.0 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), 1.0 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y bifosfato de sodio (NaH₂PO₄) 170 mg L⁻¹. En estas condiciones de cultivo permanecieron por 8 semanas donde la variable evaluada fue: número y longitud de brotes. Se obtuvo un promedio de 4.56 brotes por explante, existiendo un promedio de 2.14 brotes de 1.0 cm y 2.42 brotes de 2.0 cm de largo; no existió diferencia significativa en longitud de brotes. Se cambió el balance hormonal y se cuantificaron a las 8 semanas nuevamente, existiendo 22.3 brotes por explante, presentando un promedio de 12.6 brotes de 1.0 cm y 10.4 de 2.0 cm de longitud; no existió diferencia significativa en ninguna de las dos variables evaluadas bajo estas condiciones.

INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae comprende unas 2000 especies, principalmente en América central y América del sur, y se reporta que alrededor de 715 especies existen en nuestro país. Destacando los géneros *Mammillaria* y *Opuntia*, este último juega un papel muy importante en nuestra cultura, por su diversidad y distribución en México (Sánchez y Hernández, 2002).

Actualmente, el cultivo del nopal ha tenido una importante aceptación, no solo en nuestro país, sino en otras partes del mundo, por sus valores nutricionales y sus usos múltiples, cumple una importante función en la agricultura de subsistencia por medio de la producción de fruta, verdura, forraje, y otros usos como colorantes naturales, plantas medicinales, cercos vivientes, ornamentales, alimentos procesados, industria de fármacos, cosméticos, bebidas alcohólicas, grana de cochinilla entre otras (Casas y Barbera, 2002 ; Rodríguez-Félix, 2002).

La propagación de nopal se realiza vegetativamente a través del enraizamiento de cladodios individuales o múltiples, pequeñas porciones de cladodios maduros que comprenden dos o más areolas, o mediante el uso de frutas como propágulos (Estrada-Luna *et al.*, 1988). Hoy en día existen métodos biotecnológicos como el cultivo de tejidos vegetal, que se utilizan a gran escala en diversos países del mundo. Entre las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales se puede mencionar la micropropagación o clonación *in vitro* de plantas. (Mata *et al.*, 2001). Por lo que, Giusti *et al.*, (2002) proponen la propagación clonal a través de la micropropagación, como una vía factible para las reproducción y conservación de cactáceas.

TEORÍA

Actualmente se reporta que el territorio nacional cuenta con 50 a 70 % con zonas áridas y semiáridas. Por lo que; la agricultura en estas zonas requiere de cultivos alternativos que permitan elevar la productividad generando alimentos con poco insumo de agua (Granados 1991). *Opuntia* es una especie de rápida adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas puesto que puede ser establecida en cualquier región del mundo, ya sea en climas templados-secos, áridos y semiáridos. Entre sus principales funciones se utiliza para proteger el suelo de la erosión y restauración de los degradados, esta cactácea juega un papel ecológico decisivo al frenar la degradación de suelos deforestados en zonas áridas de México. Además, se ha convertido en un importante cultivo de frutas exóticas, hortalizas y producción de forraje en México, Estados Unidos, Chile, Argentina, Israel, Italia y Sudáfrica, donde se ha adaptado a condiciones de sequía, lluvias escasas, suelos pobres y propensos a la erosión (Pimienta-Barrios y Muñoz-Urias, 1995; Flores-Valdez, 1994). Por otro lado,

ofrecen posibilidades excepcionales para producir biomasa en zonas de escasez de agua que son útiles para la alimentación del ganado (Felker *et al.*, 2006).

El cultivo de tejidos ha demostrado ser exitoso en varias especies de la familia Cactaceae (Hubstenberger *et al.*, 1992; Ojeda-Zacarías *et al.*, 2012). El uso de la biotecnología vegetal es la disciplina que más desarrollo ha demostrado en los últimos años. Actualmente ofrece una alternativa real para la resolución de un gran número de problemas relacionados con el mejor aprovechamiento de las plantas por parte del hombre. El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que se ha utilizado con éxito para conservación de germoplasma. Por lo que, es necesario establecer técnicas de propagación que permitan incrementar la disponibilidad del material vegetal, ajustando protocolos de regeneración para cada especie en particular ya que existe el problema de que algunas son consideradas como recalcitrantes. Por los antecedentes antes mencionado el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la capacidad de regeneración del cultivar Villanueva de *Opuntia ficus-indica* que permita su multiplicación y conservación a través del cultivo *in vitro*.

PARTE EXPERIMENTAL

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía - Unidad Marín, de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante el semestre enero – junio del 2017. Los explantes usados en la investigación fueron tomados de material ya existente *in vitro*. La multiplicación de brotes consistió en utilizar explantes asépticos cultivados *in vitro*, se establecieron explantes de 1.0 cm de longitud en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con la combinación de BAP 3.0 mg L⁻¹, ANA 1.0 mg L⁻¹, fosfato diácido de sodio (NaH₂PO₄) 170 mg L⁻¹, tiamina 1.0 mg L⁻¹ piridoxina 0.5 mg L⁻¹, ácido nicotínico 0.5 mg L⁻¹, sacarosa 30 gr L⁻¹, Phytigel 4.0 g L⁻¹ y pH ajustando a 5.5. Antes del establecimiento de los explantes en el medio, este fue esterilizado en autoclave a 1.2 kg cm⁻², 121 °C, durante 15 min. Concluido el establecimiento de los explantes, estos fueron colocados en condiciones controladas temperatura de 24 ±2 °C, y fotoperiodo de 16 h luz (1800 lux) y ocho horas de oscuridad, usando lámparas de luz blanca. En estas condiciones de cultivo permanecieron por ocho semanas. El experimento consistió en establecer 10 unidades experimentales bajo un diseño completamente al azar y se evaluó la variable número y longitud de brotes. Posteriormente estos brotes se subcultivaron al medio de cultivo MS pero disminuyendo la dosis de los reguladores de crecimiento, BAP 1.0 mg L⁻¹, ANA 0.5 mg L⁻¹, fosfato diácido de sodio (NaH₂PO₄) 170 mg L⁻¹, tiamina 1.0 mg L⁻¹, piridoxina 0.5 mg L⁻¹, ácido nicotínico 0.5 mg L⁻¹, glicina 0.2 mg L⁻¹, carbón activado 2.0 gr L⁻¹ sacarosa 30 gr L⁻¹, Phytigel 4.0 gr L⁻¹ ajustando a 5.5 el pH. Después de ocho semanas se evaluó nuevamente el número y longitud de brotes. Los datos obtenidos se analizaron a través de una prueba estadística no paramétrica de X².

RESULTADOS

Después de ocho semanas se evaluó el número y longitud de brotes de 10 repeticiones a través de una X². Donde se pudo observar un promedio de 4.56 brotes por explante, y los promedios de longitud fueron de 2.14 brotes de un centímetro y 2.42 de dos, no existiendo diferencia significativa en cuanto a la longitud de brotes. Estos brotes fueron transferidos a otros balances hormonales y fue hasta las ocho semanas que se evaluaron nuevamente. Se tuvo un promedio de 22.3 brotes por explante, y los promedios de longitud fueron de 12.6 brotes de un centímetro y 2.4 de dos, no existió diferencia significativa en cuanto al número de brotes y longitud de estos por explante. Con respecto a esto, Johnson y Emino (1979), reportan que las citocininas son un factor eficiente en el rompimiento del letargo en yemas de cactáceas. La respuesta obtenida en esta investigación es mayor, comparada con otros trabajos que utilizando la combinación de auxinas y citocininas produjeron únicamente una media de 7.9 brotes, tal es el caso de los resultados de (Ault y Blackmon, 1987; Estrada y Treviño, 1991). Con respecto al enraizamiento en este cultivar no fue necesario pasar los explantes a un medio especial debido a que todos los brotes produjeron raíces en la parte basal, así como raíces adventicias.

CONCLUSIONES

Las dosis de los reguladores de crecimiento permitieron la multiplicación de brotes del cultivar Villanueva *Opuntia ficus-indica*, logrando la propagación de la especie por cultivo *in vitro* a partir de activación de las areolas como fuente de explante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ault, J.R. and W. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes*. (Cactaceae). Hort Science. 22:126-127.
2. Casas A. G. Barbera 2002. Mesoamericano domesticación y difusión. En PS Nobel [ed.], Cacti: biología y usos, 143-162. Universidad de California, Berkeley, California, EE.UU.
3. Estrada L., A. A. 1988. Producción de brotes e injertación *in vitro* de seis especie de nopal (*Opuntia* spp) originarias del altiplano potosino-zacatecano. Tesis M.C. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 160p.
4. Estrada L., A. A., J. G. Treviño R. 1991. Evaluación del comportamiento de tres variedades de nopal (*Opuntia* spp.) a la propagación *in vitro*. I Congreso Regional ZonaCentro, Aguascalientes, p.70.
5. Felker, P., Paterson, A., and Jenderek, M. M. 2006. Forage Potential of *Opuntia* Clone Maintained by the USDA, National Plant Germplasm System (NPGS) Collection. *Crop Sci*, 46:2161–2168.
6. Flores-Valdez, C. A. 1994. "Nopalitos" production, processing and marketing. In: Barbera *et al.*, (ed.). "Agroecology cultivation and uses of cactus pear ". FAO International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. pp. 92-99.
7. Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, F. Saccardo and M. Tucci. 2002. *In vitro* Propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulture*. 95(4):319-332.
8. Granados S., D. y A.D.P., Castañeda. 1991. 3ª. Reimpresión Editorial Trillas. México.
9. Hubstenberger, J.F., Clayton, P.W., and Phillips, G.C. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. High tech and micropropagation IV. Vol. 20. Ed: Bajaj, Y. P. S. Springer-Verlag, Berlin International Horticultural Congress (pp 49– 68).
10. Johnson, J. L. y E. R. Emino. 1979. Tissue culture propagation in the cactaceae. *Cactus and succulent Jour*, 51: 275-277.
11. Mata-Rosa M. Monroy de la Rosa M. A., Moebius-Goldammer K. y Chávez-Ávila V.M. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Forter, an endemic and endangered species. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37:400-404.
12. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15:473-479.
13. Ojeda-Zacarías, M.C., R.E. Vázquez-Alvarado, J.A. Santos-Haliscak, G. Moreno-Degollado, V.E. Aguirre-Arzola, L. Iracheta-Donjuan, P. López-Gómez, M. Castellanos-Juarez. 2012. Micropropagación de Pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth). *Revista de Salud Pública y Nutrición*. Ed. Especial No. 04: 119-128.
14. Pimienta-Barrios, E., and Munoz-Urias, A. 1995. Domestication of *Opuntia* and cultivated varieties. In Barbera, G., P. Inglese, and E. Pimienta-Barrios (eds.). Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. pp. 58-63
15. Rodríguez- Félix, A. 2002. Postharvest physiology and technology of cactus pear fruits and cactus leaves. In: Proc. 4th International Congress on Cactus Pear and Cochineal. A. Nefzaoui and P. Inglese (Eds). Oct. 22- 28. Hammamet, Tunisia. *Acta Hort*. 581: 191- 199.
16. Sánchez, E. and M. M. Hernández. 2002. Propagation of Mexicana cacti threatened with extinction. *Cactus and Succulent Journal*. 74 (1): 17-21.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN DIFERENTES PARTES DEL RIZOMA DE ZINGIBER OFFICINALE

Daniela Karina Segura-Palma, Paola Guadalupe Ramírez-Flores, Mayda Lizeth Ramírez-López, Patricia Ibarra-Torres

Universidad Politécnica de Guanajuato, Av. Universidad Sur 1001, Comunidad Juan Alonso, Cortazar, Guanajuato, México 38496.

RESUMEN

En las últimas décadas se ha incrementado el índice de enfermedades crónico-degenerativas, lo cual representa un alto costo para el sector salud a nivel mundial y nacional, debido al empleo de fármacos especializados. Últimamente existe un mayor interés por investigar compuestos de fuentes naturales como alternativa de uso en la prevención o inhibición de éstas enfermedades. El jengibre es una especie ampliamente empleada en la medicina tradicional, y existen estudios donde se evidencia el efecto de compuestos fenólicos sobre diversas enfermedades. Sin embargo, a la fecha los estudios no incluyen optimización de extracción de dichos compuestos, lo cual es necesario para evaluar todos los efectos asociados a la concentración de dichos compuestos. El presente trabajo tiene por objetivo optimizar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos en la pulpa, rizoma y epidermis de jengibre. Se optó por un diseño central compuesto con 2 factores y 2 bloques con 18 corridas. La extracción metanólica de compuestos fenólicos fue sólido-líquida, y la cuantificación fue por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados mostraron que el tiempo tiene un efecto en la extracción y que las condiciones óptimas de extracción son tiempo de agitación de 30 min y en 10 mL de metanol, además se aprecia que la pulpa es la parte del rizoma que mayor contenido de fenoles totales presenta. Los datos resultantes del presente trabajo se emplearán para evaluar actividad biológica antiinflamatoria relacionada con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas.

INTRODUCCIÓN

El rizoma de jengibre (*Zingiber officinale*), es una especie ampliamente utilizada de manera tradicional como especia en la elaboración de alimentos y en la medicina tradicional desde tiempos inmemorables. Se ha empleado en fresco o en seco para el tratamiento herbolario de enfermedades respiratorias, gastrointestinales, reumáticas y para aliviar el dolor de muelas¹. Existen evidencia científica que extractos acuosos o metanólicos presentan actividad anticancerígena, antialérgica, antihelmíntica, antimicrobiana, antioxidante, propiedades reductoras de colesterol útil en el tratamiento de enfermedades cardíacas.³

Los mencionados beneficios a la salud se atribuyen a ciertos grupos de compuestos presentes en el rizoma de jengibre, se ha reportado que contiene compuestos como beta-caroteno, ácido ascórbico, terpenoides, alcaloides y polifenoles como flavonoides, flavonas glucosiladas, rutina² sesquiterpenos, dietoheptanoides y compuestos relacionados con gingerol¹.

Recientemente se ha reportado la identificación y dilucidación estructural de dos nuevos fenilalcaloides presentes en el rizoma variedad roscoe proveniente de China, son los compuestos 5-hidroxi-1-(4',5'-dihidroxi-3'-metoxifenil) dodecan-3-ona y 1-(4',5'-dihidroxi-3'-metoxifenil) dodec-4-en-3-ona⁴. La dilucidación estructural de los compuestos presentes en los extractos de jengibre es parte importante de un estudio cada más fino acerca de la comprensión de los mecanismos de acción de la bioactividad reportada para dichos extractos.

De manera específica, la actividad biológica que presentan los extractos del rizoma de jengibre se han atribuido a compuestos derivados de la ruta del ácido shikímico, como los compuestos fenólicos. Es necesario evaluar el efecto de la concentración de compuestos fenólicos sobre las diferentes actividades biológicas, y descartar posibles efectos adversos que una alta concentración de compuestos fenólicos podría causar en el organismo humano. Existen poca información acerca de la optimización de extracción de compuestos fenólicos tomando en cuenta las partes de la muestra, tiempos y volúmenes de solvente. Dado lo anterior, el objetivo del presente trabajo es optimizar las condiciones de extracción (tiempo de agitación y volumen del solvente) de compuestos fenólicos en diferentes partes (epidermis, pulpa y rizoma) del jengibre (*Zingiber officinale*).

PARTE EXPERIMENTAL

Diseño de experimentos y optimización. Se realizó un diseño central compuesto, el cual consistió en 2 factores con 4 corridas y 2 réplicas, tomando 6 puntos centrales y 4 puntos axiales a 2 bloques, con un total de 18 corridas. (Cuadro 1). El cual estimará todos los efectos principales lineales y las interacciones de dos factores. Se realizó en el software Minitab 18.1 Minitab 17 Statistical Software (2018). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com). Para el experimento de optimización, se creó un diseño de caracterización con 2 factores críticos [tiempo de agitación (10 a 30 min) y volumen de solvente (5 a 10 mL)] los cuales se sabe por experiencia tienen mayor influencia en la respuesta. Para maximizar la concentración de compuestos fenólicos, 1) se realizó una prueba con el diseño de caracterización inicial para ver si hay curvatura en los factores continuos, 2) si se detecta curvatura, el segundo paso es agregar más corridas al diseño para modelar la curvatura y usar ese modelo para determinar la mejor configuración de los factores críticos.

Cuadro 1. Diseño de experimentos 2 factores, 2 bloques, 2 réplicas y 3 puntos centrales.

Punto Central	Bloques	tiempo (min)	volumen (mL)	µg EAG/ g PF*
1	1	30	5	
0	1	20	7.5	
1	1	30	10	
1	1	10	10	
1	1	10	5	
0	1	20	7.5	
1	1	30	5	
0	1	20	7.5	
1	1	10	10	
1	1	30	10	
1	1	10	5	
-1	2	30	7.5	
-1	2	20	5	
0	2	20	7.5	
0	2	20	7.5	
0	2	20	7.5	
-1	2	10	7.5	
-1	2	20	10	

*micro gramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en peso fresco

Preparación de las muestras.

Las muestras de jengibre se obtuvieron de un mercado local, se lavaron primero con agua de grifo y posteriormente, agua destilada y se dividieron en epidermis (E), pulpa (P) y rizoma completo (R). Cada estructura se homogenizó y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Extracción de compuestos fenólicos.

Para la extracción de compuestos fenólicos a 1 g de muestra a -20°C se agregó el volumen de metanol según correspondiera a la corrida del diseño experimental y se dejó en agitación a 200 rpm en condiciones de oscuridad según los tiempos establecidos en la corrida del diseño. Posteriormente, los extractos fueron filtrados y almacenados en atmósfera inerte (nitrógeno gaseoso de alta pureza) a -20°C para el posterior análisis. Todos los extractos se realizaron por triplicado. ¹

Cuantificación de fenoles totales.

A 100 µL de cada extracto se le adicionó 0.75 mL del reactivo Folin Ciocalteau diluido 10 veces con agua destilada. La mezcla se dejó reposar durante 5 min en ausencia de luz. Después de este tiempo se agregó 0.75 mL de solución de Carbonato de sodio (NaHCO₃) a concentración de 60 g/L, para neutralizar la reacción. Se dejó reposar 90 min para obtener la lectura a 725 nm. La cuantificación se realizó por triplicado. Las absorbancias obtenidas se interpolaron en una curva de calibración con

ácido gálico como estándar externo (Fig. 1). Los resultados se expresaron en μg equivalentes de ácido gálico por gramo en peso fresco (μg EAG/g PF).

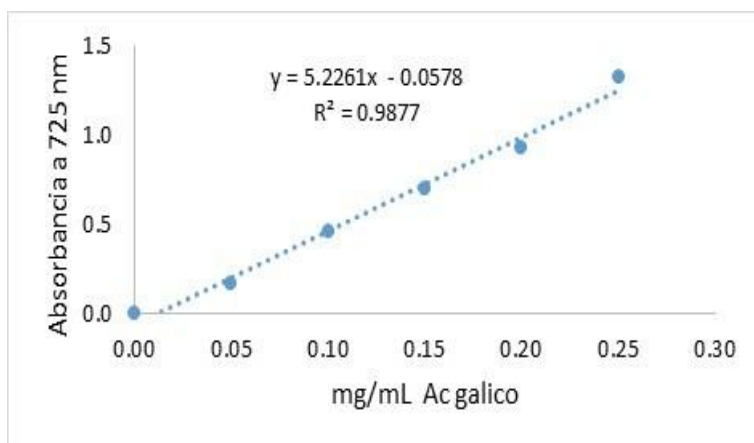


Figura 1. Curva de calibración de fenoles totales con ácido gálico

RESULTADOS

Los resultados de la optimización de extracción de compuestos fenólicos en diferentes partes del rizoma de jengibre (*Zingiber officinale*) se muestran en los gráficos de superficie de respuesta (Fig. 2). Para la pulpa, rizoma completo y epidermis, la configuración óptima de extracción fue de 30 min de agitación y 10 mL de metanol con una respuesta pronosticada de 495.75, 348.33 y 211.33 μg EAG / g PF de concentración de fenoles totales respectivamente (Figura 2A, 2B y 2C respectivamente).

En los tres casos el análisis mostró que el factor tiempo de agitación fue el que tuvo mayor influencia sobre la concentración de fenoles totales. Los tres modelos cuadráticos respectivos explicaron arriba del 99% de la variación de fenoles totales en las muestras descritas.

Los resultados de concentración concuerdan con lo anteriormente reportado para contenido de compuestos fenólicos en pulpa de jengibre². No se aceptarán trabajos en PDF solo se considerarán los que sean enviados en formato Word.

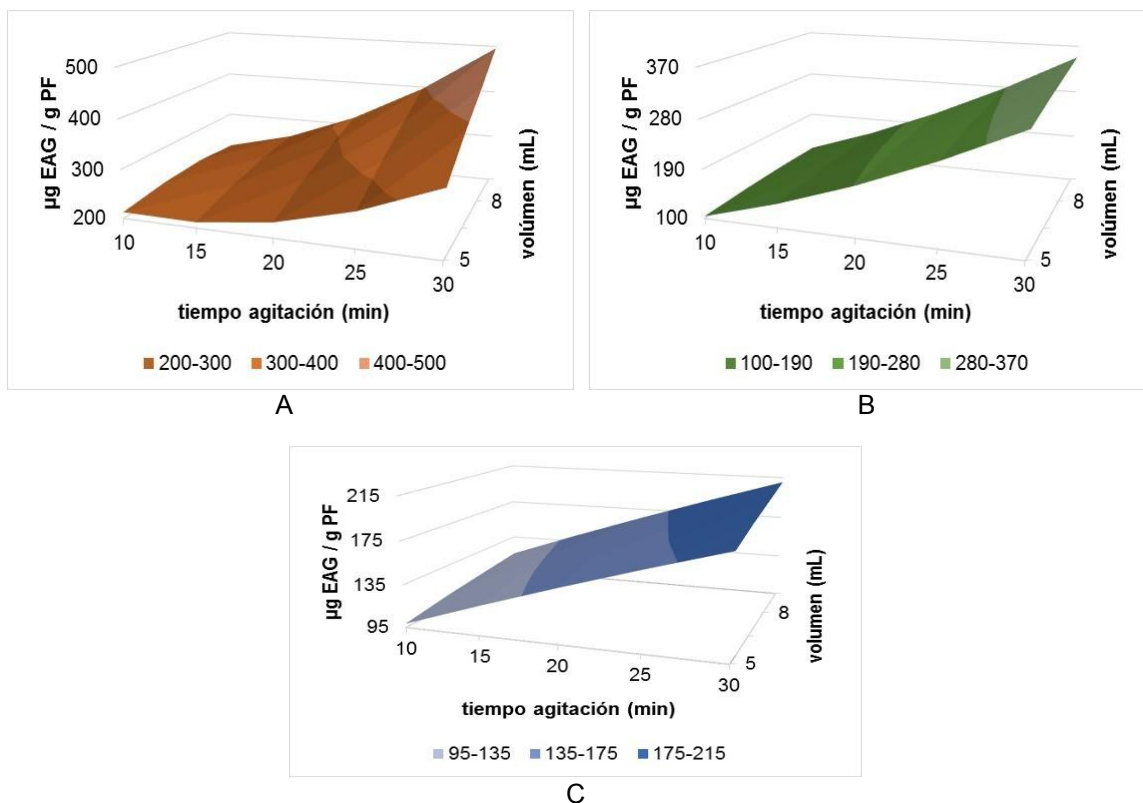


Figura 2. Gráfico de superficie de respuesta de las condiciones de extracción de fenoles totales en pulpa (A), rizoma completo (B) y epidermis (C) de jengibre.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede asumir que es preferente extraer los compuestos fenólicos de la pulpa del rizoma de jengibre, debido a que mostró el mayor contenido de éstos compuestos. Al estar asociados a diferentes actividades biológicas, los presentes resultados se emplearán para realizar evaluaciones de actividad antiinflamatoria in vitro, con condiciones óptimas de extracción en jengibre.

BIBLIOGRAFÍA

1. S.W. Lee, J.H. Lim, M.S. Kim, J.H. Jeong, G.Y. Song, W.S. Lee, M.C. Rho, "Phenolic compounds isolated from *Zingiber officinale* roots inhibit cell adhesion", Food Chemistry, Vol. 128, 3, 2011, pp. 778-782. ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.095>.
2. A. Ghasemzadeh, H.Z.E. Jaafar, A. Rahmat, "Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)", Molecules, Vol. 15, 2010, pp. 4324-4333. <https://doi.org/10.3390/molecules15064324>
3. W.J. Li, R.J. Lin, Y.T. Yeh, H.L. Chen, C.Y. Chen, "Phenylalkanoids from *Zingiber officinale*", Chemistry of Natural Compounds, Vol. 49, 3, 2013.
4. H.M. Wang, C.L. Kao, W.J. Li, "Two New Phenylalkanoids from the Rhizomes of *Zingiber officinale*", Chem Nat Compd, Vol. 54,7, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2246-x>

RESPUESTA FISIOLÓGICA A ESTRÉS POR NaCl EN *Portulaca oleracea* EN FASE FLORAL

Guevara O., B. K.¹; Trejo T., L. I.¹; Gómez M., F. C.¹; Ruíz P., L. M.¹;
García M., S.²; Escalante E., J. A.¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco.56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

²CONACYT-CIATEJ Plant Biotechnology. Camino Arenero 1227. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México.

RESUMEN

Si bien se ha demostrado que la verdolaga (*Portulaca oleracea*) presenta alta tolerancia a la salinidad adaptándose al estrés y mejorando sus respuestas fisiológica y morfológica; el estadio de desarrollo es un factor que podría alterar dicha adaptabilidad. Es por ello que en esta investigación se estimaron los efectos de la salinidad en cinco niveles, en la respuesta fisiológica de esta especie. Se emplearon plantas de 50 días de desarrollo que fueron trasplantadas y regadas con solución nutritiva de Hogland, a la cual se adicionaron concentraciones diferenciales de NaCl (0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 M). Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones, distribuidas completamente al azar. Después de 14 días de exposición, se determinó la conductancia estomática, transpiración y lecturas SPAD. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente usando el software SAS. El aumento en la concentración de NaCl en la solución nutritiva, no afecta significativamente la conductancia estomática y la tasa de transpiración; sin embargo, si se observa una tendencia a disminuirlas. Las lecturas SPAD si mostraron diferencias significativas entre tratamientos, disminuyendo sus valores con el aumento de la concentración de NaCl. Los resultados obtenidos permiten inferir que en *P. oleracea*, la fase de desarrollo es un factor que determina el éxito adaptativo y por tanto el mantenimiento de sus funciones metabólicas.

INTRODUCCIÓN

Se ha determinado que en plantas glicófitas la salinidad ocasiona supresión del crecimiento y bajo potencial osmótico (Marcum, 2006). Sin embargo, el estrés osmótico que se relaciona la mayoría de las veces con el efecto iónico de las sales, puede producir efectos diversos en las plantas de acuerdo con su grado de desarrollo. En arroz durante la fase de plántula los valores de conductividad estomática, transpiración e intercambio gaseoso disminuyen significativamente mientras que en fase madura dichas variables no se alteran de forma significativa (Moradi y Ismahil, 2007). La respuesta al estrés también puede variar entre variedades del mismo cultivo (Méndez *et al.*, 2016). En verdolaga la respuesta al estrés entre fases fenológicas y entre accesiones también es variada. Por ejemplo, Uddin *et al.* (2012) encontraron que en fase de plántula *P. oleracea* tuvo una concentración significativa de compuestos antioxidantes y bioelementos aunque en fase madura las concentraciones de dichos compuestos dejan de ser relevantes. Por otra parte, en ejemplares de 21 días después de la germinación el efecto del estrés salino a una concentración de 200 mM NaCl ocasiona aumento en las concentraciones de prolina, betaxantinas y betacianinas (Murly *et al.*, 2015). Tales estudios muestran que *P. oleracea* es capaz de resistir la salinidad adaptándose al estrés y mejorando su respuesta fisiológica y morfológica (Yazici *et al.*, 2007; Alam *et al.*, 2015). En el contexto anterior, este estudio tuvo como objetivo el análisis de la respuesta fisiológica de verdolaga al estrés salino en fase de floración madura para evaluar sus componentes.

PARTE EXPERIMENTAL

Esta investigación se condujo bajo condiciones de invernadero en Montecillo, Estado de México. Se emplearon plantas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) de 50 d de edad, en fase vegetativa madura. Se evaluaron cinco tratamientos consistentes en distintos niveles de salinidad inducida por NaCl (0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 M), que fueron suministrados a la solución nutritiva de Hoagland (Kafi y Rahimi, 2011) con la que fueron regadas durante 14 d las plantas de verdolaga.

Se condujo un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue un contenedor de unicele de 250 mL de capacidad con una planta de verdolaga, empleando perlita como sustrato. Los volúmenes de solución regados por unidad experimental fueron 150 mL.

Las variables evaluadas transpiración y conductancia estomática se midieron con un porómetro marca Li-Cor modelo LI-1600; las lecturas SPAD, se evaluaron con un medidor de clorofila marca Minolta modelo SPAD 502 plus. Las variables fueron tomadas sobre la superficie de la cuarta hoja por debajo de la zona apical ya que son las de mayor tamaño.

Con los resultados obtenidos se realizó análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey (0.05) usando el software SAS (SAS, 2011).

RESULTADOS

Dentro de las variables fisiológicas, la tasa fotosintéticamente activa, transpiración y conductancia estomática resultan principalmente afectadas por el estrés salino (Yordanov *et al.*, 2003).

En este estudio la tasa transpiratoria y la conductancia estomática no fueron afectados de manera significativa con el aumento de la concentración salina (**Cuadro 1**). Asimismo, de manera contraria a lo aquí observado, en algunas accesiones de 29 días estudiadas por Alam *et al.* (2015) la transpiración se vio reducida cronológicamente con el aumento de la concentración salina hasta en 73.48% y la conductancia estomática se redujo hasta en 97.78%.

Cuadro1. Tasa transpiratoria (E) y conductancia estomática (Gs) de plantas de verdolaga en fase floral, después del tratamiento durante 14 d con diferentes niveles de salinidad inducida por NaCl.

NaCl (M)	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Gs (mmol m ⁻² s ⁻¹)
0.00	1.88 ± 0.69 a	39.9 ± 15.42 a
0.25	1.50 ± 0.66 a	31.8 ± 14.11 a
0.50	2.60 ± 0.30 a	51.3 ± 6.10 a
0.75	2.75 ± 0.77 a	53.3 ± 15.5 a
1.0	2.05 ± 0.73 a	39.9 ± 14.3 a

Medias ± DE con letras iguales en cada columna, indican que no existen diferencias significativas (Tukey, 0.05).

El análisis estadístico mostró que existe influencia significativa de los tratamientos de salinidad en los valores de unidades SPAD ($P \leq 0.0020$; Figura1). Se observó que a concentraciones iguales y superiores a 0.75 M causan reducción significativa en esta variable.

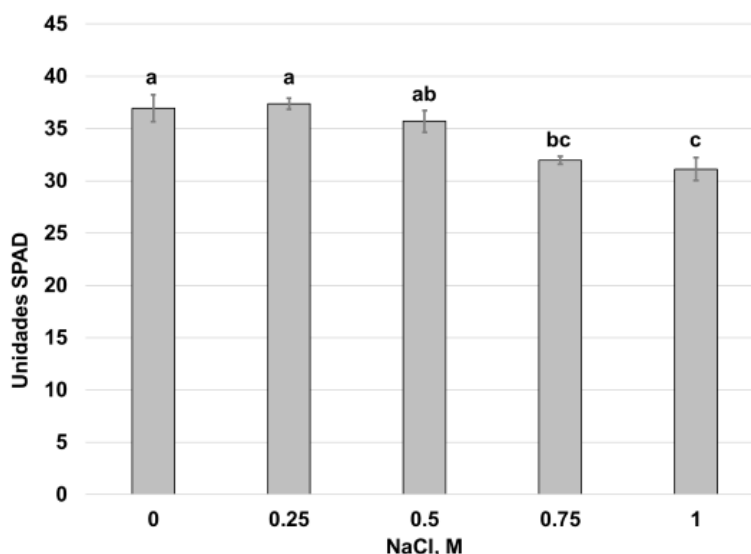


Figura 1. Unidades SPAD en hojas de plantas de verdolaga en fase de floración, después del tratamiento durante 14 d con diferentes niveles de salinidad inducida por NaCl. Medias ± DE con letras distintas, indican diferencias significativas (Tukey, 0.05).

En plantas de verdolaga de 21 días expuestas a deshidratación/rehidratación se observó que hubo una reducción significativa del contenido de clorofila y posteriormente después de la rehidratación el contenido de clorofila se recuperó paulatinamente (Jin *et al.*, 2015). Resultados similares se observaron en este estudio al evaluar cuantitativamente el verdor de las hojas, un indicador indirecto del pigmento fotosintético.

CONCLUSIONES

El estado fenológico de floración no compromete el metabolismo fotosintético de verdolaga aún en condiciones de salinidad en niveles superiores a 0.5 M NaCl. Los valores de SPAD podrían alterarse, aunque no de manera significativa, lo que faculta a esta especie a ser tolerante al estrés salino.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Alam, J. A. Shukor, Y. M. Rafii, A. A. Hamid, "Effect of Salinity on Biomass Yield and Physiological and Stem-Root Anatomical Characteristics of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) Accessions", *BioMed Res. Inter.*, 2015, pp. 1-15.
2. A. J. A. Méndez, S. G. Salgado, I. C. L. Espinoza, J. R. H. H. Mendoza, E. M. Castelán, S. S. Córdova, C. I. M. Hidalgo, "Relación entre parámetros fisiológicos en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) bajo suspensión de riego previo a la cosecha", *Agroproductividad*, Vol. 9, 3, 2015. pp. 15-20.
3. F. Moradi, A. M. Ismahil, "Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice", *Annals of Botany*, Vol. 99, 2007, pp. 1161-1173.
4. I. Yazici, I. Turkan, A. H. Sekmen, T. Demiral, "Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation", *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 61, 1, 2007. pp. 49-57.
5. I. Yordanov, V. Velikova, T. Tsonev, "Plant responses to drought and stress tolerance", *Bulg. J. Plant Physiol*, Vol. 2003, 2003, pp. 187-206.
6. K. B. Marcum, "Use of saline and non-potable water in the turfgrass industry: constraints and developments", *Agricultural Water Management*, Vol. 80, 1, 2006. pp. 132-146.
7. K. R. Murly, B. A. Hanson, D. A. Dudle. "Alternative Strategies in Response to Saline Stress in Two Varieties of *Portulaca oleracea* (Purslane)", *Plos One*, 2015, pp. 1-18.
8. K. Uddin, A. J. Shukor, A. Eaquib, M. I. Razi, "Evaluation of Antioxidant Properties and Mineral Composition of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) at Different Growth Stages", *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 13, 2012, pp. 10257-10267.
9. M. Kafi, Z. Rahimi, "Effect of salinity and silicon on root characteristics, growth, water status, proline content and ion accumulation of purslane (*Portulaca oleracea* L.)", *Soil Science and Plant Nutrition*, Vol. 57, 2011, pp. 341-347.
10. R. Jin, H. Shi, C. Han, B. Zhong, Q. Wang, Z. Chan, "Physiological changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) after progressive drought stress and rehydration", *Scientia Horticulturae*, Vol. 194, 2015, pp. 215-221.
11. SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.

CERIO AFECTA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y PROLINA EN PLANTAS DE ARROZ SOMETIDAS A ESTRÉS OSMÓTICO

Sara Monzerrat Ramírez-Olvera¹, Libia Iris Trejo-Téllez^{1*}, Fernando Carlos Gómez Merino¹, Juan Antonio Pérez Sato², Cesar Antonio Casasola Elizondo¹, María de la Luz Buendía Valverde¹, Víctor Hugo Carbajal Vázquez¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ramirez.sara@colpos.mx; tlbia@colpos.mx*; fernandg@colpos.mx; casasola.cesar@colpos.mx; buendia.luz@colpos.mx; carbajal.victor@colpos.mx

²Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, pantonio@colpos.mx

RESUMEN

El arroz es el segundo cereal más producido en el mundo y es el alimento básico en la dieta de más de la mitad de la población del planeta. El déficit hídrico afecta el metabolismo de la plantas, al reducir el potencial hídrico y turgencia de las células, sin embargo, existen elementos que permiten disminuir estos efectos. En este contexto, el objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de la aplicación de Ce en la concentración de clorofila total y prolina de plantas de arroz sometidas a estrés osmótico. Plántulas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. indica) cultivar Morelos A-98 de 12 d de edad, fueron colocadas en solución Magnavaca por 7 d y posteriormente en solución Yoshida. Catorce días después se trataron con 25 y 50 μM CeCl_3 y a los 28 d posteriores, las plantas se sometieron a estrés osmótico con la adición de PEG 8000 al 10% (PEG). La aplicación de 25 y 50 μM no afectó significativamente la concentración de clorofila total; de la misma manera, no se observaron efectos significativos en la concentración de prolina en vástago, mientras que la aplicación 25 y 50 μM Ce incrementó significativamente la concentración de prolina en raíz. Asimismo, la aplicación de Ce en plantas de arroz bajo estrés osmótico, incrementó la concentración de prolina, que le permiten a la planta tolerar situaciones de estrés osmótico.

INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los cultivos más importante países en desarrollo y es el alimento básico de más de la mitad de la población mundial (Seck *et al.*, 2012). Sin embargo, su producción es vulnerable a los efectos del cambio climático, como es la sequía, la cual afecta a millones de personas en el mundo, además de tener un profundo impacto en la agricultura, los recursos hídricos los ecosistemas y el bienestar humano básico (Dai, 2011).

La sequía desencadena una serie de respuestas negativas en la planta, altera la expresión génica y el metabolismo celular, lo que a su vez genera cambios en el crecimiento y desarrollo y repercute directamente en el rendimiento (Nuruzzaman *et al.*, 2013). Por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas que le permitan a la planta tolerar situaciones de estrés, donde la nutrición vegetal es de suma importancia.

Actualmente se consideran 17 elementos como esenciales para las plantas superiores, al ser requeridos para completar su ciclo de vida. Sin embargo, existen otros elementos que a pesar de no ser considerados elementos esenciales, promueven el crecimiento y mejoran las características de las plantas, cuya función depende de la concentración del elemento y de la especie vegetal. Estos elementos pueden promover el crecimiento, mejoran la resistencia a factores de estrés biótico como daño por patógenos y herbivoría, así como a factores abióticos como sequía, salinidad y toxicidad o deficiencia de nutrimentos; dentro de esta clasificación se encuentran el cerio (Ce) (Pilon-Smits *et al.*, 2009; Trejo-Téllez *et al.*, 2016).

El Ce pertenece al grupo de las tierras raras, grupo caracterizado por su difícil separación y por compartir propiedades químicas muy similares. Del grupo de elementos que conforman las tierras raras, el Ce es de los más abundantes en la corteza terrestre, encontrándose a concentraciones de 60 ppm en el suelo (Kokare *et al.*, 2010); concentraciones similares a las de Cu y Zn en el rango de 20-60 mg kg^{-1} (Hu *et al.*, 2006; Shtangeeva y Ayrault, 2007). Este elemento es considerado benéfico, al mejorar el metabolismo vegetal y el crecimiento de plantas en condiciones de estrés. En plantas de maíz (*Zea mays*) crecidas bajo estrés salino, el tratamiento vía foliar con 75 μM $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$, incrementó el peso de biomasa fresca, mejoró la apertura estomática y disminuyó la concentración de peróxido de hidrógeno en hojas (Hong *et al.*, 2017).

Por tal motivo el uso de elementos benéficos como el Ce, representa una alternativa para tolerar las condiciones de estrés y mejorar la productividad de cultivos como el arroz. En este contexto el objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de la aplicación de cloruro de cerio ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en plantas de arroz sometidas a estrés osmótico.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal, método de cultivo y tratamientos

Se utilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa*) del cultivar Morelos A-98, procedentes del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, unidad Zacatepec, Morelos, México. Las semillas se germinaron en medio MS suplementado con agarosa al 3%, para lo cual se colocaron en oscuridad por 3 d y posteriormente en luz natural por 11 d. Enseguida las plántulas se transfirieron a solución nutritiva Magnavaca por 7 d y después se reemplazó por solución Yoshida. Catorce días después se adicionaron 25 y 50 μM Ce usando como fuente $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 28 d después del inicio de tratamientos las plantas se sometieron a estrés osmótico, para lo cual se adicionó PEG 8000 al 10% (PEG) a la solución nutritiva. A los 7 d del inicio del tratamiento con PEG, las plantas se retiraron de la solución nutritiva, se enjuagaron, se separan en vástago y raíz y se maceraron con nitrógeno líquido para determinar la concentración de clorofila y prolina.

Determinación de clorofila total y prolina

De tejido previamente macerado en nitrógeno líquido se tomaron 60 mg y se realizó una triple extracción etanólica (80, 80 y 50%), posteriormente se incubaron a 80 °C, durante 20 min y centrifugadas a 14000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes de cada extracción se mezclaron, y se determinó en vástago la concentración de clorofilas a y b leyendo los extractos a 635 y 645 nm en un espectrofotómetro y mediante la suma de la concentración de clorofila a y b se determinó la concentración de clorofila total. Para la determinación de prolina se maceraron 500 mg de vástago y 1000 mg de raíz de arroz con ácido sulfosalicílico al 3%. A 2 mL del extracto obtenido se le añadieron 2 mL de ninhidrina ácida y ácido acético, enseguida se incubó por 1 h en baño maría a 100 °C y se incorporaron 4 mL de tolueno, se agitaron y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 520 nm. La concentración de prolina se determinó mediante una curva estándar elaborada con L-Prolina.

Análisis estadístico

A los datos de concentraciones de clorofila en vástago y prolina en vástago y raíz se realizó un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

La adición de 25 y 50 μM Ce y PEG a plantas de arroz bajo estrés osmótico no afectó significativamente la concentración de clorofila total, sin embargo, la adición de PEG y 50 μM Ce + PEG a las plantas incrementó la concentración de clorofila en 22.22%, mientras que la adición de 25 μM Ce aumentó la concentración de clorofila en 11.11%, respecto al testigo (**Figura 1**). En otras investigaciones se ha reportado que la adición de Ce a plantas incrementa la concentración de clorofila, al mejorar las actividades de las enzimas en la síntesis de clorofila y en la tasa fotosintética, además de tener un efecto protector de las células a las especies reactivas de oxígeno (Fashui *et al.*, 2002).

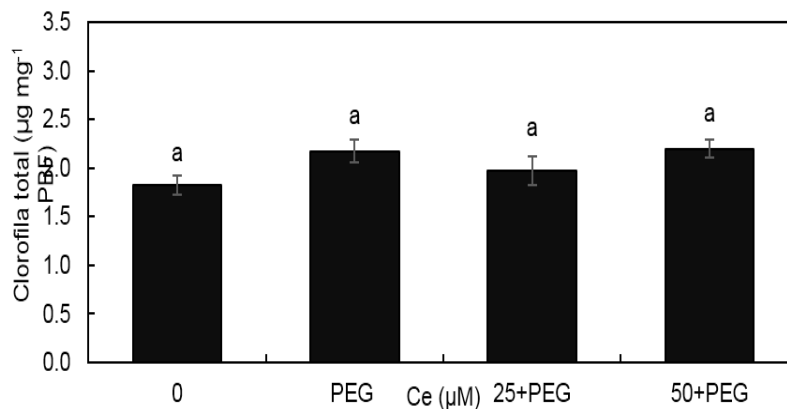


Figura 1. Concentración de clorofila total en plantas de arroz tratadas con 0, 25 y 50 μM Ce y sometidas a estrés osmótico con la adición de PEG 8000 al 10%. PBF: Peso de Biomasa Fresca. Medias \pm DE con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

La adición de 25 y 50 μM Ce a plantas de arroz sometidas a estrés con PEG no afectó significativamente la concentración de prolina (Figura 2).

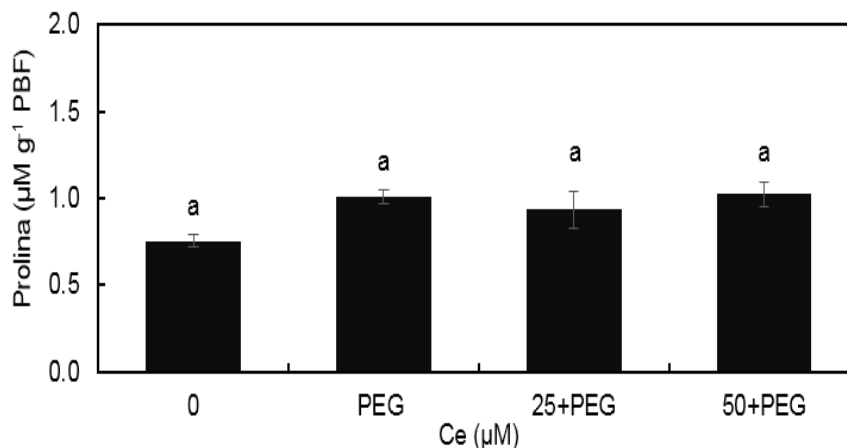


Figura 2. Concentración de prolina en vástago de plantas de arroz tratadas con 25 y 50 μM Ce y sometidas a estrés osmótico con la adición de PEG 8000 al 10%. PBF: Peso de Biomasa Fresca. Medias \pm DE con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

La adición de PEG no incrementó significativamente la concentración de prolina en raíz, sin embargo, la adición de 25 μM Ce la aumentó en 42.86% y la aplicación de 50 μM Ce incrementó la concentración en 37.04%, respecto al testigo (Figura 3). Estos resultados son de suma importancia, dado que la prolina participa en la protección de las membranas, además de eliminar radicales libres en condiciones de estrés (Székely, 2007).

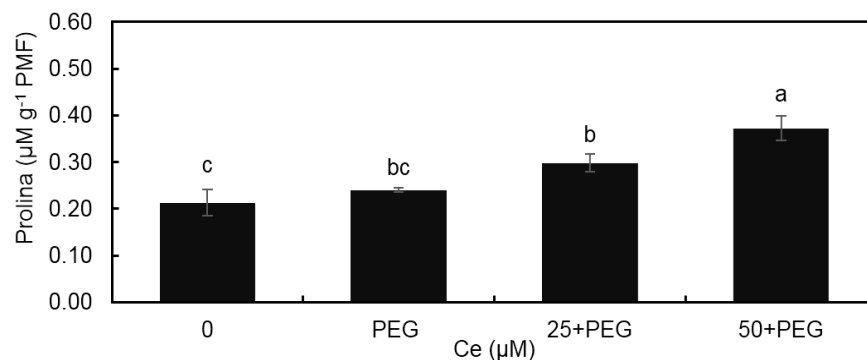


Figura 3. Concentración de prolina en raíz de plantas de arroz tratadas con 25 y 50 µM de Ce y sometidas a estrés osmótico con la adición de PEG 8000 al 10%. PMF: Peso de Biomasa Fresca. Medias ± DE con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

La adición de Ce a plantas de arroz Morelos A-98 bajo estrés osmótico, incrementa la concentración de prolina en raíces; mientras que en hojas, aumenta la concentración de clorofila total.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Dai. Drought under global warming: a review. Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change, Vol. 2, 1, 2011, pp. 45-65.
2. B. N. Kokare, A. M. Mandhare, M. A. Anuse. Liquid-Liquid Extraction of Cerium (IV) From Salicylate Media Using N-7v-Octylaniline In Xylene As An Extractant., J. Chil. Chem. Soc. Vol. 55, 4, 2010, pp. 431-435.
3. E. A. Pilon-Smits, C. F. Quinn, W. Tapken, M. Malagoli, M. Schiavon. Physiological functions of beneficial elements. Current Opinion in Plant Biology, Vol. 12, 3, 2009, pp. 267-274.
4. F. Hong, C. Qu, L. Wang. Cerium Improves Growth of Maize Seedlings via Alleviating Morphological Structure and Oxidative Damages of Leaf under Different Stresses. J. Agr. Food Chem., Vol. 65, 41, 2017, pp. 9022-9030.
5. G. Székely. The regulatory roles of P5CS genes in Arabidopsis thaliana. Ph. D. Thesis. 2007. University of Szeged, Hungary.
6. H. Fashui, W. Ling, M. Xiangxuan, W. Zheng, Z. Guiwen. The effect of cerium (III) on the chlorophyll formation in spinach. Biol. Trace Elem. Res., Vol. 89, 3, 2002, pp. 263-276.
7. I. Shtangeeva, S. Ayrault. Effects of Eu and Ca on yield and mineral nutrition of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. Environ. Exp. Bot. Vol. 59,1, 2007. pp. 49-58.
8. L. I. Trejo-Téllez, F.C Gómez-Merino, G. Alcántar-González. Elementos benéficos: potencialidades y limitaciones. In: Nutrición de Cultivos. Segunda Edición. Alcántar-González G, Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC. (eds.). Montecillo: Ed. Colegio de Postgraduados. 2016. pp. 59-101.
9. M. Nuruzzaman, A. M. Sharoni, S. Kikuchi. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. Frontiers in Microbiology. 2013. 4, 248.
10. P.A. Seck, A. Diagne, S. Mohanty, M.C. Wopereis. Crops that feed the world 7: Rice. Food security, Vol. 4, 1, 2012, pp.7-24.
11. Z. Hu, S. Haneklaus, G. Sparovec, E. Schnug. Rare earth elements in soils. Comm. Soil Sci. Plant Anal. 2006. 37(9-10): 1381-1420.

LA APLICACIÓN EXÓGENA DE REGULADORES DE CRECIMIENTO MEJORA EL TIEMPO A ANTESIS Y VIDA DE LA FLOR DE LA ORQUÍDEA *Laelia anceps subesp. anceps*.

Víctor Hugo Carbajal Vázquez¹, Olga Tejeda-Sartorius¹, Libia Iris Trejo-Téllez¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, *olgats@colpos.mx; carbajal.víctor@colpos.mx; tlibia@colpos.mx

RESUMEN

La aplicación exógena de reguladores de crecimiento ha sido usada exitosamente para modificar la floración de diversas especies de híbridos de orquídeas. Se planteó como objetivo analizar el efecto de benziladenina y ácido giberélico en los días a inflorescencia visible, días a antesis y vida de la flor de *Laelia anceps* subesp. *anceps*, especie silvestre de México. Las plantas fueron tratadas vía foliar con diferentes concentraciones de benziladenina (BA): 0.5, 1.0 y 1.5 mL L⁻¹, y ácido giberélico (AG): 400, 600 y 800 mg L⁻¹, en cantidad aproximada de 30 a 35 mL por planta. La aplicación exógena de benziladenina (BA) y ácido giberélico (AG) no disminuye los días a inflorescencia visible de *Laelia anceps*, pero las concentraciones de 1 mL BA L⁻¹ y de 400 y 800 mg AG L⁻¹ disminuyen el periodo a antesis. Asimismo, las concentraciones de 1 y 1.5 mL BA L⁻¹, y de 400 mg AG L⁻¹ prolongan la vida de la flor. Los reguladores de crecimiento probados tienen efectos positivos al reducir el tiempo a antesis y prolongar la vida de la flor de la orquídea analizada.

INTRODUCCIÓN

La floración natural de las orquídeas inicia en respuesta a factores ambientales, como temperatura, fotoperiodo, irradiancia, disponibilidad de agua, entre otros, y a rutas endógenas (controladas genéticamente) (Amasino y Michaels, 2010; Bernier y Périlleux, 2005), asimismo, en respuesta a hormonas endógenas (Goh, 1985).

El desarrollo de las flores de las orquídeas empieza con la transición floral, y continúa con el inicio y la formación de los órganos florales (Yu y Goh, 2000). Pero para propósitos comerciales, la floración en orquídeas es un problema porque tienen periodos juveniles largos y las plantas deben alcanzar un cierto grado de madurez para florecer (López y Runkle, 2005).

La aplicación exógena de reguladores de crecimiento se ha usado con éxito para modificar la floración de muchas especies de orquídeas. Tal es el caso de citoquininas (N⁶ benziladenina –BA) para inducción de la floración de diferentes híbridos de orquídeas; y de giberelinas, para transformación de meristemos apicales de los tallos en inflorescencias terminales e inducción de diversas especies de orquídeas (Matsumoto, 2006).

El objetivo de la presente investigación fue probar diferentes concentraciones de benziladenina y ácido giberélico en los días a inflorescencia visible, días a antesis y vida de la flor de *Laelia anceps* subesp. *anceps*.

PARTE EXPERIMENTAL

Se seleccionaron plantas de *Laelia anceps* subesp. *anceps* con 4 a 7 pseudobulbos y con brotes vegetativos de 3 a 5 cm. Se dejaron crecer a 10 cm como máximo para iniciar los tratamientos inductivos a floración.

Los tratamientos consistieron en aspersiones de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento: 6BA (6-benziladina) (CyStar®): 0.5, 1.0 y 1.5 mL L⁻¹ (tratamientos 1 al 3); así como de AG3 (ácido giberélico a 8.2%) (Gibiotin®) en concentraciones de 400, 600 y 800 mg L⁻¹ (tratamientos 4 al 6). Se utilizó agua destilada como testigo. Los volúmenes de las soluciones asperjadas oscilaron de 30-35 mL.

Se aplicaron cuatro ciclos de pulverizaciones, cada una semanalmente, las cuales se hacían por las tardes, de 17:00 a 19:00 h, cuando la temperatura del invernadero osciló entre 20 y 25°C.

Se usó un diseño completamente al azar de tratamientos, cada uno con ocho repeticiones, considerando una maceta con una planta como unidad experimental.

Durante el desarrollo vegetativo, las plantas de todos los tratamientos se fertilizaron con Peters 30-10-10 (300, 100, 100 mg L⁻¹). Para la inducción floral, además de la aplicación de reguladores de crecimiento, las plantas se fertilizaron con NPK (100, 200, 200 mg L⁻¹) semanalmente, en cantidad de 50 mL por unidad experimental.

Se midieron las siguientes variables: i) días a inflorescencia visible (DIFV), considerada desde la fecha de inicio de aplicación de los tratamientos (IAT) hasta el momento cuando la inflorescencia tenía 5 cm de largo; ii) días a antesis (DAN), considerada desde la fecha de DIFV hasta la antesis de la primera flor del racimo; iii) vida de la flor (VF) en días, considerada desde la antesis hasta la senescencia de la primera flor.

Con los resultados obtenidos se realizaron análisis de varianza (PROC ANOVA) y prueba de comparación de medias (Tukey, α 0.05), con el paquete estadístico SAS (SAS, 2011).

RESULTADOS

La aplicación exógena de reguladores de crecimiento no mostró diferencias estadísticas para DIFV, sin embargo, es importante mencionar que las diferentes concentraciones analizadas de dichos productos, incrementaron el porcentaje de tiempo para mostrar la inflorescencia hasta 42%, excepto en T3 (1.5 mL BA L⁻¹), el cual disminuyó ese periodo en 26%, en relación con el testigo (Figura 1). Matsumoto (2006) reportaron que la aplicación exógena de AG aceleró la emergencia de la inflorescencia de *Miltonopsis* "Bert Field" por 10.9 y 14.9 días, y por 48.7 días para *M. "Rouge Akatsuka"*, lo cual es contrario a nuestros datos, ya que el AG incrementó ese periodo hasta por 12 días con la dosis 800 mg L⁻¹. Sin embargo, un efecto en la reducción en ocho días de este periodo se observó con BA (1.5 mL L⁻¹).

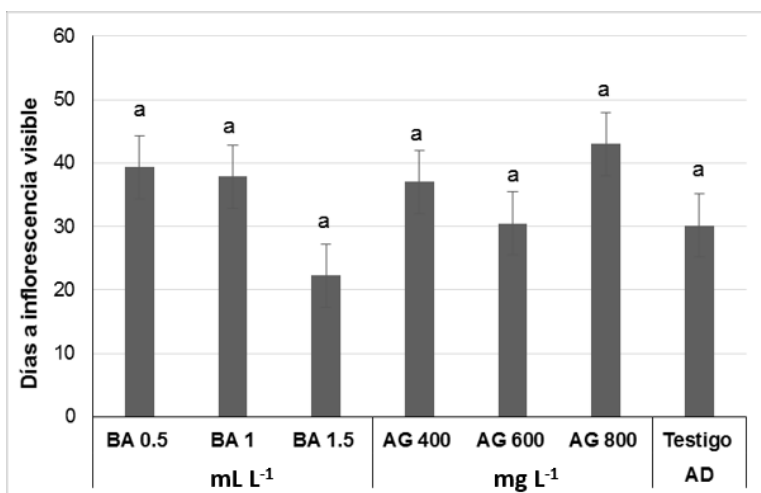


Figura 1. Días a inflorescencia visible de *Laelia anceps* subesp. *anceps* con aplicación exógena de reguladores de crecimiento, en diferentes concentraciones de benziladenina (BA) y ácido giberélico (AG). AD=Agua destilada. Medias \pm DE con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Por su parte, los resultados mostraron diferencias estadísticas en DAN, en donde el tiempo más prolongado para la antesis se presentó en el testigo (142 días), en relación con los tratamientos donde se aplicaron 1 mL L⁻¹ de BA (T2), 400 (T4) y 600 (T6) mg L⁻¹ de AG los cuales tardaron 97, 91 y 101 días, respectivamente, en llegar a la antesis (Figura 2). Estos datos son contrarios a lo indicado por Blanchard y Runkle (2008) quienes reportaron que la aplicación de BA no afectó significativamente los días a antesis de *Phalaenopsis* "Brother Apollo" ni de *P. "Golden Treasure"*.

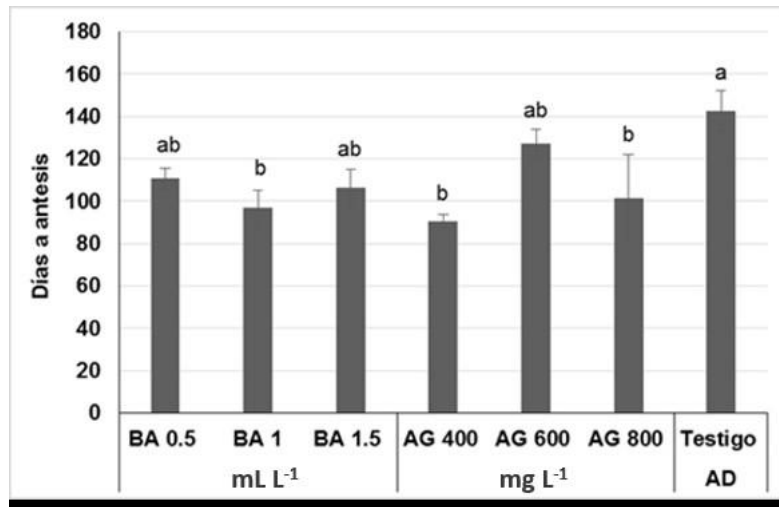


Figura 2. Días a antesis de *Laelia anceps* subesp. *anceps* con aplicación exógena de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones de benziladenina (BA) y ácido giberélico (AG). AD=Aguá destilada. Medias \pm DE con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

La vida de la flor (VF) fue significativamente mayor en los tratamientos con 1 y 1.5 mL BA L⁻¹ y 400 mg AG L⁻¹, en relación con el testigo, por 8, 10 y 8.5 días respectivamente (Figura 3), lo cual es diferente a lo reportado por Wu y Chang (2008), quienes no encontraron diferencias estadísticas con la aplicación de BA para *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel "Queen" ni para *Doritaenopsis* Sogo Yukidian "V3", en relación con plantas donde no se aplicó dicho regulador de crecimiento.

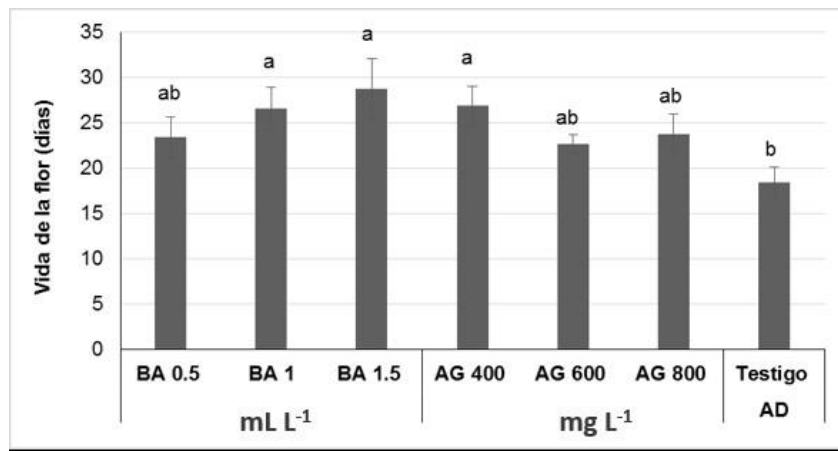


Figura 3. Vida de la flor (días) de *Laelia anceps* subesp. *anceps* con aplicación exógena de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones de benziladenina (BA) y ácido giberélico (AG). AD=aguá destilada. Medias \pm DE con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

La aplicación exógena de benziladenina (BA) y ácido giberélico (AG) no disminuye los días a inflorescencia visible de *Laelia anceps* subesp. *anceps*, pero las concentraciones de 1 mL BA L⁻¹ y de 400 y 800 mg AG L⁻¹ disminuyen el periodo a antesis. Asimismo, las concentraciones de 1 y 1.5 mL BA L⁻¹, y de 400 mg AG L⁻¹ prolongan la vida de la flor. La disminución del tiempo a antesis hasta

en 51 días, y el alargamiento de la vida de la flor hasta en 10 días son resultados importantes para el avance de la programación de floración para estas plantas, desde el punto de vista comercial. Además, muestran la necesidad de seguir explorando la efectividad de los productos en diferentes concentraciones, tiempos y formas de aplicación.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. J. Goh, "Flowering in tropical orchids" Proc. Eleventh World Orchid Conf., 1985, pp. 166-173.
2. G. Bernier, C. Périlleux, "A physiological overview of the genetics of flowering time control", *Plant Biotechnol. J.*, Vol. 3, 2005, pp. 3-16.
3. H. Yu, C. J. Goh, "Identification and characterization of three orchid MADS-Box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition", *Plant Physiol.*, Vol. 123, 2000, pp. 1325-1336.
4. R. G. Lopez, E. S. Runkle, "Environmental physiology of growth and flowering of orchids", *HortScience*, Vol. 40, 2005, pp. 1969-1973.
5. M. G. Blanchard, E. S. Runkle, "Benzyladenine Promotes Flowering in *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis* Orchids", *J. Plant Growth Regul.*, Vol. 27, 2008, pp. 141-150.
6. P. H. Wu, D. C. N. Chang, "The use of N-6-benzyladenine to regulate flowering of *Phalaenopsis* orchids", *HortTechnology*, Vol. 19, 1, 2009, pp. 200-203.
7. R. M. Amasino, S. D. Michaels, "The timing of flowering", *Plant Physiol.*, Vol. 154, 2010, pp. 516-520.
8. SAS Institute Inc., *SAS/STAT Users Guide. Version 9.3* (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA), 2011.
9. T. K. Matsumoto, "Gibberellic acid and benzyladenine promote early flowering and vegetative growth of *Miltoniopsis* orchid hybrids", *HortScience*, Vol. 41, 1, 2006, pp. 131-135.

VANADIO EN EL RENDIMIENTO DE CHILE JALAPEÑO, POBLANO Y SERRANO

María de la Luz María Buendía-Valverde, Tarsicio Corona-Torres, Libia I. Trejo-Téllez, Fernando C. Gómez-Merino, César A. Casasola-Elizondo, Sara M. Ramírez-Olvera, Víctor H. Carbajal-Vázquez.

Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. e-mail: buendia.luz@colpos.mx

RESUMEN

En los últimos años los niveles de metales pesados en el ambiente se han elevado considerablemente a causa de la quema de combustibles fósiles, la contaminación, el uso excesivo de fertilizantes y la actividad industrial. Estudios en plantas con algunos de estos elementos como el vanadio (V) son contradictorios, de ahí que algunos autores sugieren que es un micronutriente para especies marinas y terrestres. Por el contrario, otras investigaciones concluyen que el V es tóxico aún a bajas concentraciones y que puede causar marchitamiento de hojas, inhibición del crecimiento, reducción de frutos, clorosis, etc. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el rendimiento de fruto en tres variedades de plantas de chile, Jalapeño, Poblano y Serrano, irrigadas con solución nutritiva Steiner, y a la cual se adicionaron 0, 0.75 y 1.5 mM V a partir de metavanadato de amonio. Durante la fase experimental se realizaron cinco cortes en intervalos de siete días para evaluar los componentes del rendimiento: frutos por planta, rendimiento por planta, longitud de fruto y ancho de fruto. Se encontró que los frutos cosechados por planta la variedad Jalapeño presentó una reducción del 34.4% en el tratamiento 0.075 mM V; mientras que en Poblano, se presentan incrementos significativos con respecto al testigo con 0.75 y 1.50 mM V.

INTRODUCCIÓN

Los metales son elementos químicos que pueden estar presentes en el ambiente de forma natural y por procesos antropogénicas, algunos participando como micronutrientes esenciales para las plantas, tal es el caso del cobre, fierro, magnesio, manganeso, níquel y zinc (Singh *et al.*, 2011).

Aunque el nombre de metales pesados es un nombre impreciso, generalmente se utiliza para definir algunos elementos con propiedades metálicas como: ductilidad, conductividad, estabilidad como catión, densidad mayor a 5 g cm⁻³ y número atómico mayor a 20 (WHO, 1992). Dentro de este grupo encontramos metales que aún están a discusión si son esenciales o no, debido a que por lo menos en algunos organismos pueden participar en algún proceso biológico, tal es el caso del molibdeno (Mo), cobalto (Co) y el vanadio (V) (Raskin *et al.*, 1994).

En el caso particular del V, es un metal de transición, con número atómico 23, y densidad relativa de 6.11 g cm⁻³, predomina en los estados de oxidación +3, +4 y +5. Es utilizado en aleaciones con otros elementos como el aluminio (Al), titanio (Ti), boro (B), entre otros., en la industria agrícola se usa en la elaboración de fungicidas, insecticidas y fertilizantes, no obstante, en la actualidad su principal uso es en la elaboración de electrodos de baterías recargables y alcalinas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Jaishankar *et al.*, 2014).

Aunque el V ha recibido poca atención, en plantas superiores las investigaciones son controversiales, algunos autores sugieren que este elemento inhibe el crecimiento a concentraciones bajas, mientras que otros indican que al incrementar la concentración de V en tejido vegetal (10 ng g⁻¹) incrementa el crecimiento, a lo cual algunos autores como Arnon y Wessel declaran que el V es un elemento esencial para algunas plantas (Olness *et al.*, 2002).

Bowman (1983), menciona que el V altera el equilibrio nutrimental en la planta, y esto se refleja cuando la absorción de P se inhibe conforme incrementa la concentración de V; por el contrario, la absorción del V se inhibe a medida que incrementa la concentración de P en *Neurospora crassa*. Por su parte Olness *et al.* (2002), establecen que estos dos elementos compiten entre sí por el mismo sistema de transporte a nivel membrana celular.

Saco *et al.* (2013), reportan que concentraciones de 160 a 400 µM V incrementa la longitud de raíz, biomasa seca y fresca de raíz y hoja, longitud y anchura de hoja en frijol; así mismo Yang *et al.* (2011) encontraron que en alfalfa cultivada en suelos contaminados con 25 y 50 mg de V kg⁻¹, presentaron mayor biomasa y mayor altura. Por su parte Vachirapatama y Jirakiattikul (2008), reportan que concentraciones de 80 mg V reduce la longitud de tallos, de raíces, el número de hojas y el peso de la biomasa seca en raíz, tallo y hoja.

México es el centro de domesticación de diversos cultivos, entre ellos el chile (*Capsicum annum* L.), en general, se consume como parte de la dieta diaria de la población, es por ello que se cultiva en distintos estados del país, donde la producción anual se estima en 2.2 millones de toneladas de fruto fresco (SAGARPA, 2015).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del V en el rendimiento de frutos de tres variedades de chile, Jalapeño, Poblano y Serrano.

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se llevó a cabo en el Colegio de Posgraduados, campus Montecillo, ubicado en Texcoco, Estado de México. Se utilizaron semillas híbridas de chile de las variedades Jalapeño “Emperador” NUN 70030, Poblano “Capulín” y Serrano “Coloso”, las cuales fueron germinadas en charolas de unicel con turba, cuando las plántulas alcanzaron una longitud de 15 cm, fueron trasplantadas en macetas de plástico negro de 7 L de capacidad, utilizando tezontle como sustrato, mismas que fueron distribuidas en un diseño completamente al azar con 6 repeticiones. Se aplicó un sistema de riego por goteo con solución nutritiva Steiner adicionada con 0, 0.75 y 1.5 μM Cd. Después de 80 días de tratamiento y cinco cortes de fruto se midieron los componentes del rendimiento (frutos totales por planta, rendimiento total, ancho de fruto y longitud media de fruto). Con los resultados obtenidos se realizó análisis de varianza y prueba de comparación de medias con la prueba LSD ($P \leq 0.05$), para cada metal y variedad evaluada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos estudios de los efectos tóxicos de V en plantas es atribuida a la similitud estructural entre iones vanadato ($\text{H}_2\text{VO}_4^{2-}$) y fosfato (H_2PO_4^-) (Vachirapatama *et al.*, 2005).

Número de frutos por planta

Los tratamientos de V en la variedad Serrano no presentan efectos significativos diferentes en el número de frutos con respecto al testigo. En la variedad Jalapeño existe una reducción significativa en el número de frutos con la dosis 0.75 μM V, la cual fue de 34.4%, respecto al testigo; mientras que en la variedad Poblano, destacan los aumentos significativos en el número de frutos con ambos tratamientos con V (0.75 y 1.50 μM), que superan al testigo en más de 6 y 8 veces, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de frutos totales de tres variedades de chile tratadas con vanadio bajo condiciones de invernadero.

V (μM)	Jalapeño	Poblano	Serrano
0.00	20.33 \pm 2.04 a	1.17 \pm 1.20 b	90.50 \pm 12.76 a
0.75	13.33 \pm 2.09 b	6.83 \pm 1.66 a	106.83 \pm 11.33 a
1.50	17.83 \pm 3.32 ab	8.50 \pm 1.81 a	93.50 \pm 10.13 a

Medias \pm DE en cada columna con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

Rendimiento por planta

Las diferentes concentraciones de V no tuvieron un efecto significativo en el rendimiento de la variedad Serrano. Por el contrario, la variedad Jalapeño presenta diferencias significativas en la concentración de 0.75 μM V, produciendo una reducción del 60% con respecto al testigo. Por otra parte, en la variedad Poblano aumenta significativamente el rendimiento con ambas concentraciones de V, al compararlas con el testigo (Cuadro 2).

Estudios realizados en soya, mostraron una disminución del rendimiento del orden de 20% cuando se trataron con V (Olness *et al.*, 2000). Asimismo, Singh (1971) determinó que concentraciones de V superiores a 0.05 ppm son perjudiciales para el cultivo de maíz; mientras que, concentraciones por debajo de esta concentración, aumentan significativamente el rendimiento de grano. Por su parte, Gil *et al.* (1995) reporta que en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas en soluciones

nutritivas con 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mg V kg⁻¹, disminuye el rendimiento conforme aumenta la concentración de V.

Cuadro 2. Rendimiento total de tres variedades de chile tratadas con vanadio bajo condiciones de invernadero.

V (μM)	Jalapeño	Poblano	Serrano
0.00	540.86 ± 94.88 a	71.03 ± 59.64 b	592.06 ± 75.66 a
0.75	327.89 ± 49.90 b	464.52 ± 82.90 a	691.21 ± 65.20 a
1.50	463.50 ± 91.89 ab	317.14 ± 78.34 a	560.68 ± 49.50 a

Medias ± DE en cada columna con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

Ancho medio de fruto

Los valores promedio del ancho de frutos de plantas tratadas con V no muestran diferencias significativas en las variedades Jalapeño, Poblano y Serrano (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ancho promedio de frutos (mm) de tres variedades de chile tratadas con vanadio bajo condiciones de invernadero.

V (μM)	Jalapeño	Poblano	Serrano
0.00	28.49 ± 1.76 a	42.50 ± 3.56 a	12.70 ± 0.82 a
0.75	26.53 ± 3.20 a	46.06 ± 6.92 a	16.55 ± 4.85 a
1.50	26.63 ± 2.49 a	39.50 ± 7.84 a	12.41 ± 0.97 a

Medias ± DE en cada columna con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

Longitud media de fruto

Los tratamientos con 0.75 y 1.5 μM V no presentan diferencias significativas en la longitud de fruto de las variedades Jalapeño, Poblano y Serrano, al compararla con su testigo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Longitud promedio de frutos totales de tres variedades de chile tratadas con vanadio bajo condiciones de invernadero.

V (μM)	Jalapeño	Poblano	Serrano
0.00	7.83 ± 0.64 a	12.59 ± 2.41 a	7.01 ± 0.36 a
0.75	6.64 ± 0.77 a	14.90 ± 6.26 a	6.80 ± 0.43 a
1.50	7.11 ± 0.64 a	10.29 ± 1.59 ab	6.67 ± 0.35 a

Medias ± DE en cada columna con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

En la variedad Poblano, el V incrementó el número de frutos por planta y el rendimiento del fruto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Olness, D. W. Archer, R. W. Gesch, J. Rinke, "Resin-extractable phosphorus, vanadium, calcium and Magnesium as factors in maize (*Zea mays* L.) yield", J. Agronomy and Crop Science, Vol. 188, 2002, pp. 94-101.
2. J. Bowman, "Vanadate uptake in *Neurospora crassa* occurs via phosphate transport system II", Journal of Bacteriology, Vol. 153, 1, 1983, pp. 286-291.

3. Saco, S. Martín, P. San José, "Vanadium distribution in roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*: morphological and ultrastructural effects" *Biologia Plantarum*, Vol. 57, 1, 2013, pp. 128-132.
4. Raskin, P. N. Kumar, S. Dushenkov, D. E. Salt, "Bioconcentration of heavy metals by plants", *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 5, 3, 1994, pp. 285-290.
5. J. Gil, C. E. Álvarez, M. C. Martínez, N. Perez, "Effect of vanadium on lettuce growth, cationic nutrition, and yield", *Journal of Environmental Science and Health Part A*, Vol. 30, 1, 1995, pp. 73-87.
6. J. J. Rodríguez-Mercado, M. A. Altamirano-Lozano, "Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad", *Rev. Int. Contam. Ambient.*, Vol. 22, 4, 2006, pp. 173-189.
7. J. Yang, Y. Teng, J. Wang, J. Li, "Vanadium uptake by alfalfa grown in V-Cd-contaminated soil by pot experiment", *Biol. Trace Elem. Res.*, Vol. 142, 2011, pp. 787-795.
8. M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B. B. Mathew, K. N. Beeregowda, "Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals", *Interdisciplinary Toxicology*, Vol. 7, 2, 2014, pp. 60-72.
9. N. Vachirapatama, Y. Jirakiattikul, "Effect of vanadium on growth of Chinese green mustard (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *parachinensis*) under substrate culture", *Songklanakar Journal of Science and Technology*, Vol. 30, 4, 2008, pp. 427-431.
10. N. Vachirapatama, Y. Jirakiattikul, G. Dicoski, A. T. Townsend, P. R. Haddad, "On-line preconcentration and sample clean-up system of vanadium as 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) and hydrogen peroxide ternary complex in plant tissues by ion interaction HPLC", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 543, 2005, pp. 70-76.
11. R. Singh, N. Gautam, A. Mishra, R. Gupta, "Heavy metals and living systems: An overview", *Indian J. Pharmacol*, Vol. 43, 3, 2011, pp. 246-253.
12. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2015) Producción de chile mexicano. (25 de febrero de 2017). Disponible en línea en: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/produccion-del-chile-mexicano>, consultado: julio 1, 2017.
13. WHO. Environmental Health Criteria 134, "Cadmium", World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Ginebra, Suiza. 1992.

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CRÓNICOS DE OXITETRACICLINA EN EL ORGANISMO MODELO DAPHNIA MAGNA, SOBRE SU DESARROLLO POBLACIONAL

Sofía Angelica García Vargas¹, Yessica Alejandra Linares González², Vladimir Serkin³, Laura Morales Lara⁴, Ivonne Perez Xochipa⁴ y Ricardo Dario Peña Moreno³

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ²Posgrado de Cs. Ambientales-ICUAP, ³Centro de Química-ICUAP, ⁴Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.

RESUMEN

Actualmente, los antibióticos desempeñan un papel importante en las industrias agrícola y ganadera, y su uso ha ido en aumento en muchas partes del mundo. Dentro de los antibióticos empleados, las tetraciclinas son el tercer antibiótico más consumido siendo la más utilizada la oxitetraciclina con fines veterinarios como base de tratamientos profilácticos debido a que presenta varias ventajas por ser económico, eficiente y fácil de manejar. La oxitetraciclina está considerada entre los "microcontaminantes emergentes" y provoca aumento de la resistencia en la población bacteriana, así como diversos efectos adversos en animales de consumo humano. Su presencia en cuerpos de agua dulce ahora está siendo considerada como una amenaza biológica, y el estudio de sus efectos crónicos en animales se debe realizar en modelos que permitan esclarecer el impacto de oxitetraciclina en el medio en el que desarrollan, como parte del bioma regular de un medio acuático. Por lo tanto, en este trabajo evaluamos los efectos de la exposición crónica de *Daphnia magna* en medios de cultivo con oxitetraciclina a concentraciones de 25 mg/L, 10 mg/L y 4 mg/L monitoreando los cambios durante 39 días, observando afectaciones en su maduración sexual, tiempo de expulsión de neonatos, así como su capacidad de reproducción.

INTRODUCCIÓN

La existencia de fármacos de aplicación en humanos y veterinarios en diferentes compartimentos presentes en el medio ambiente ha representado un serio problema por varios años. Una variedad de medicamentos y aditivos para piensos están aprobados para su uso en la ganadería y medicina de animales de compañía (Avisar, et al., 2009), (Sarmah et al., 2006). Entre los medicamentos empleados en la agricultura, los antibióticos se encuentran entre los más utilizados para la salud y el manejo de los animales. Su principal uso en la ganadería no es solo para tratar enfermedades sino también para mejorar el crecimiento y la eficiencia de la alimentación en el ganado. Los antibióticos desempeñan un papel importante en las industrias agrícolas y ganaderas modernas y su uso ha ido en aumento en muchas partes del mundo (Sarmah et al., 2006). Las tetraciclinas son el tercer antibiótico más consumido, después de la penicilina y las quinolonas, y debido a su uso indiscriminado se ha detectado un número creciente de bacterias resilientes a las tetraciclinas (Pereira et al., 2010).

Las tetraciclinas se han detectado ampliamente en diversos compartimentos acuáticos, como el agua superficial (0.11 µg/L), fluidos (48 µg/L) y efluentes (3.6 mg/L) de plantas de tratamiento de aguas residuales, estiércol líquido (4.0 mg/kg) y suelo fertilizado con estos tipos de estiércol (43.4-198.7 µg/kg) así como aguas superficiales y subterráneas adyacentes a las granjas porcinas (1.0-2.0 µg/L) y lagunas porcinas (25-410 µg/L) (Kim et al., 2012).

En este grupo, la tetraciclina más empleada es la oxitetraciclina, la cual se usa con fines veterinarios además de ser también de consumo humano (Avisar, et al., 2009). En animales, generalmente se utiliza como base de tratamientos profilácticos debido a que presenta varias ventajas por ser económico, eficiente y fácil de manejar (Gallina et al., 2008). Este compuesto farmacéutico se encuentra entre los llamados genéricamente "microcontaminantes emergentes" y como se mencionó anteriormente ha sido encontrado en lagos, ríos y aguas subterráneas. Así, la detección y efectos secundarios de oxitetraciclina en agua ha ganado atención e importancia pues su presencia en diferentes cuerpos de agua representa un riesgo medioambiental y de salud para el humano debido a que su sobreuso incrementa la resistencia en la población bacteriana y diversos efectos adversos en diversos animales de consumo humano, y en aquellos que se encuentran conformado las bases de la cadena alimenticia, como el crustáceo de agua dulce *Daphnia magna*. Por lo que la contaminación por antibióticos en fuentes de aguas dulces ahora está siendo considerada como una amenaza biológica potencial junto con pesticidas y otros contaminantes como los metales pesados,

amenaza que se ve incrementada cuando estos contaminantes se incorporan al ciclo del agua, lo que favorece su distribución hacia otros compartimentos del medio ambiente, incluyendo aguas subterráneas (Avisar, et al., 2009).

El estudio de sus efectos crónicos en animales se debe realizar en modelos que permitan esclarecer el impacto en los organismos, así como en el medio en el que desarrollan, como parte del bioma regular de un medio acuático. Por lo tanto, en este trabajo describimos un modelo matemático logístico del crecimiento poblacional de *Daphnia magna* expuesta a oxitetraciclina, considerando que el organismo de estudio es un herbívoro que habita los sistemas de agua dulce, y conforma base importante de las cadenas alimentarias y es consumido por carnívoros primarios y otros carnívoros; por lo que *D. magna* es considerada como la especie indicadora acuática más ampliamente utilizada. Este crustáceo se utiliza en pruebas de toxicidad aguda y crónica con antibióticos (entre otros tóxicos), para evaluar sus efectos a concentraciones detectadas ambientalmente (Boxall et al., 2003). Con este fin, se registran diferentes parámetros del desarrollo poblacional para evaluar los efectos de los antibióticos en este organismo como el monitoreo del tamaño corporal, cambio morfológico en el tamaño de la descendencia dafnida y la tasa de supervivencia, así como la tasa de fecundidad (Hanazato, 2001).

TEORÍA

Los efectos provocados por el antibiótico oxitetraciclina en las concentraciones 25 mg/L, 10 mg/L y 4 mg/L puedan ser observados macroscópicamente al producirse cambios en su periodo de crecimiento y madurez sexual, viéndose una reducción en el número de neonatos producidos por hembra grávida.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó la estandarización de la población de *Daphnia magna* de acuerdo a la norma mexicana NMX-AA-087-SCFI-1995, para verificar que la población cumple con los parámetros que exige esta norma para realizar evaluaciones de toxicidad en una población de individuos desarrollada con condiciones estandarizadas, lo cual se comprueba cumpliendo con el valor de CE_{50} correspondiente al tóxico de referencia dicromato de potasio en solución, cuya presencia en agua se evaluó de acuerdo a la norma NMX-AA-044-SCFI-2001. Una vez completada esta parte y comprobada la calidad de la población en la cual se evaluarán los efectos de oxitetraciclina, se procedió a determinar la CE_{50} correspondiente a este fármaco utilizando tres concentraciones las cuales fueron: 400 mg/L, 200 mg/L y 100 mg/L para esto se utilizaron neonatos menores de 24 h provenientes de la tercera generación de una sola hembra grávida; los resultados obtenidos se analizaron y procesaron en el programa STARGRAFIC mediante el método Probit estableciendo un intervalo de confianza de 95% para los datos obtenidos. Determinada la concentración media letal se procedió a realizar los cálculos correspondientes para determinar las concentraciones a las cuales se realizaría la prueba crónica llegando así a establecer también tres concentraciones las cuales son: 25 mg/L, 10 mg/L y 4 mg/L, cada tercer día se realizaba el recambio total del medio de cultivo así como el conteo de la población, contabilizando el número de muertes y el número de nacimientos. Al inicio de esta prueba se utilizaron diez neonatos menores de 24 h en 120 mL del medio con su respectiva concentración, así como un lote control con las mismas características.

RESULTADOS

Los datos obtenidos al exponer a 15 neonatos menores a las 24 h en un volumen total de 30 mL a tres concentraciones diferentes fueron los siguientes:

Tabla 1 Resultados obtenidos de la exposición de neonatos de *Daphnia magna* con oxitetraciclina.
Concentraciones

400 mg/L	13	15
	14	15
200 mg/L	1	8
	2	11
100 mg/L	1	2
	0	3

Los datos procesados fueron los correspondientes a la exposición aguda a las 48h mediante el modelo Probit por el programa SATARGRAFIC, esto debido a que en ese tiempo se registró la CE₅₀. Siendo los resultados de este análisis los siguientes:

**Exposición aguda de oxitetraciclina en neonatos de *Daphnia magna*
 con intervalos de confianza del 95.0%**

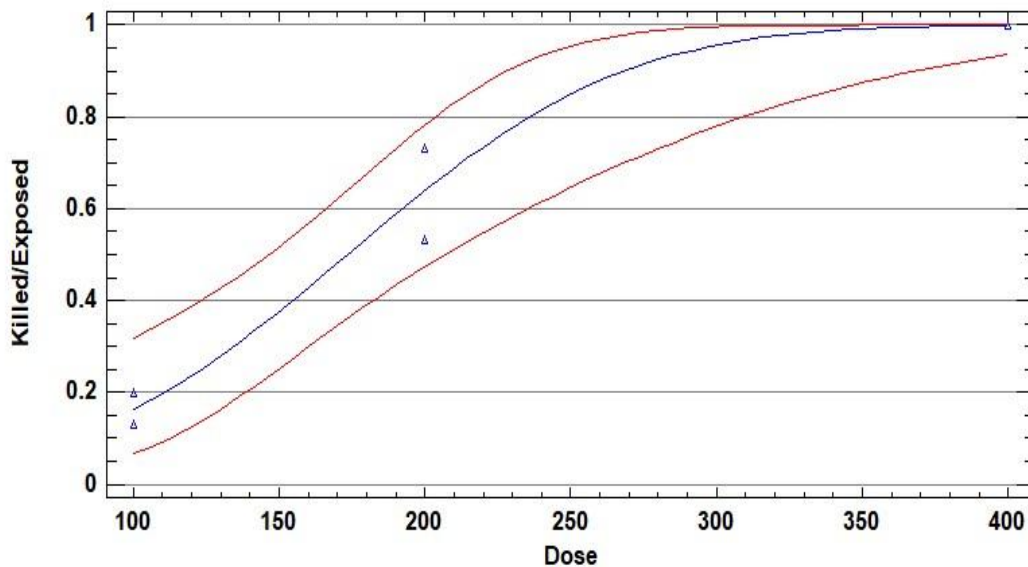


Gráfico 1. Exposición aguda en neonatos menores a 24 h de *Daphnia magna* a concentraciones de 400 mg/L, 200 mg/L 100 mg/L. Las líneas rojas representan los datos ingresados al programa y la azul corresponde al ajuste de ambas de acuerdo al modelo probit.

La determinación de la CE 50 permite conocer la sensibilidad del organismo y con ello determinar las concentraciones para la exposición crónica. La prueba fue realizada en medios con 25 mg/L, 10 mg/L y 4 mg/L de oxitetraciclina al exponer en diez neonatos y monitoreándolos durante 39 días.

Exposición crónica

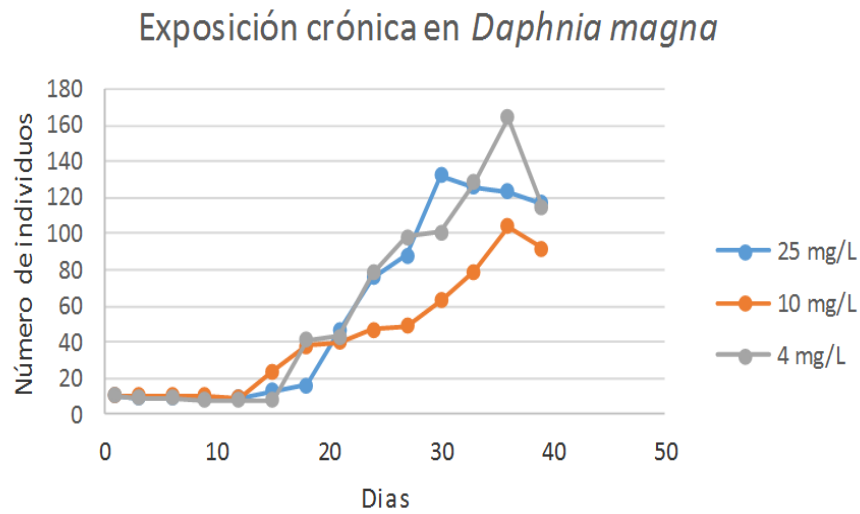


Gráfico 2. Número de individuos registrados ante la exposición crónica de oxitetraciclina durante 39 días.

El gráfico 2 muestra el efecto crónico del antibiótico evaluado a lo largo de su desarrollo poblacional presentando para los tres casos un crecimiento de tipo logístico, debido a que después de cierto tiempo la población comienza a estabilizarse.

Para conocer más a detalle el comportamiento de los gráficos, se utilizó la ecuación de Malthus, la cual nos permite determinar la constante de proporcionalidad de la población de acuerdo a un determinado tiempo mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{dP}{dt} = rP(t) \quad (1)$$

Donde:

P= Población

T= Tiempo

r = Es una constante de proporcionalidad

Esta ecuación describe la dinámica población en su fase exponencial, como se observa en el gráfico 3; esta fase se encuentra entre el día 18 hasta el 30, a partir del cual comienza a disminuir la población. El análisis a detalle de esta sección se puede observar en el gráfico 3.

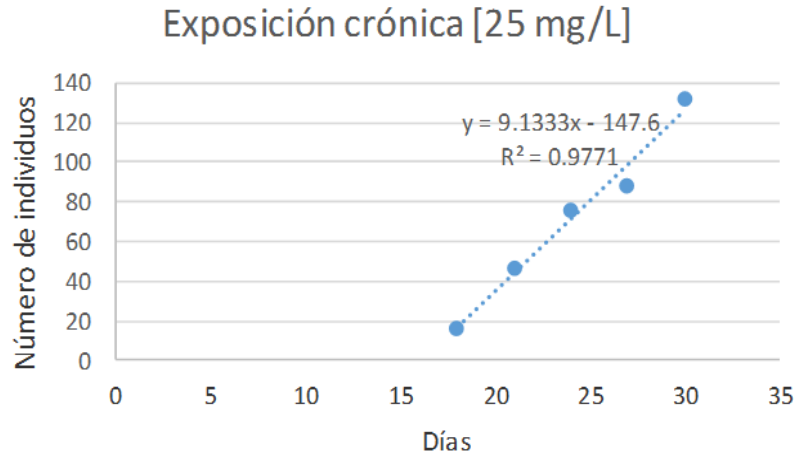


Gráfico 3. Fase del crecimiento exponencial de *Daphnia magna* en un medio con 25 mg/L de oxitetraciclina. La ecuación que representa al gráfico nos permite conocer la tasa de crecimiento de este organismo a un determinado tiempo X.

Conociendo la tasa de crecimiento de la población con las condiciones descritas en el gráfico 3, se procedió a utilizar la ecuación logística desarrollada por el matemático belga Pierre-François Verhulst que es la siguiente:

$$\frac{dP}{dt} = r P \left(1 - \frac{P}{K} \right) \quad (2)$$

En donde al igual que la ecuación 1; P corresponde a la población, r a la constante pero K para este caso representa la capacidad de carga máxima del medio el cual es de 132 individuos, donde al sustituir quede de la siguiente forma:

$$\frac{dP}{dt} = 9.1333 \left(1 - \frac{P}{132} \right) \quad (3)$$

La ecuación resultante nos sirve para describir el modelo de crecimiento logístico correspondiente a la curva de color azul mostrada en el gráfico 2.

Estas mismas ecuaciones se utilizaron para los otros dos escenarios en los cuales se expuso a *Daphnia magna*, a concentraciones de 10 mg/L y 4 mg/L respectivamente.

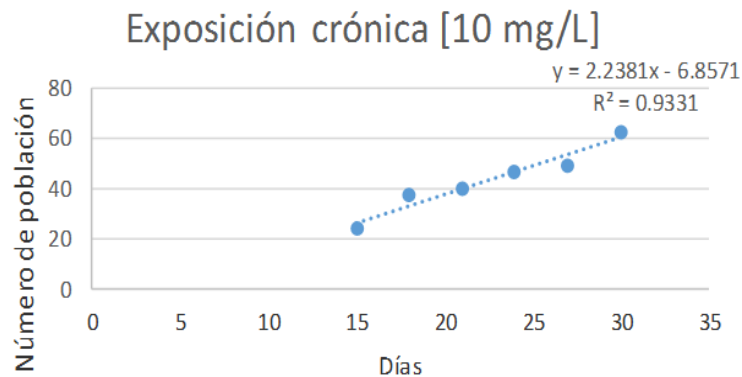


Gráfico 4 Fase exponencial del crecimiento poblacional de *Daphnia magna* de la exposición crónica con 10 mg/L durante. La pendiente de la ecuación que representa al gráfico corresponde a la tasa de crecimiento.

Al obtener la tasa de crecimiento, se puede sustituir en la ecuación de crecimiento logístico así como con el punto máximo de población registrada, siendo la ecuación para este escenario la siguiente:

$$\frac{dP}{dt} = 2.2381 \left(1 - \frac{P}{92} \right) \quad (4)$$

Dicha ecuación nos permitiría predecir el comportamiento de la curva logarítmica mostrada en color anaranjado del gráfico 2.

La tercera concentración que se utilizó para la exposición crónica consistió en 4 mg/L de oxitetraciclina en el medio. El gráfico 5 corresponde al crecimiento exponencial obtenido de monitoreada a *Daphnia magna* durante 39 días.

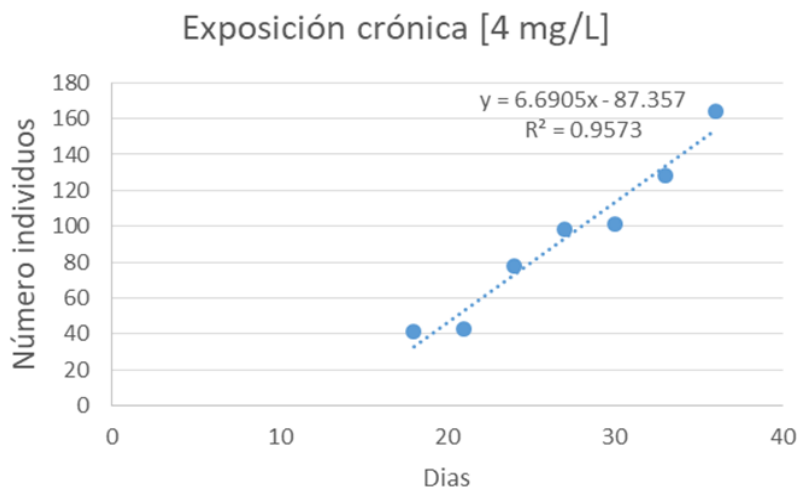


Gráfico 5 Fase exponencial del crecimiento poblacional de *Daphnia magna* en un medio con una concentración de oxitetraciclina de 4 mg/L. La pendiente de la ecuación que representa al gráfico corresponde a la tasa de crecimiento.

Una vez establecida la tasa de crecimiento con base al gráfico 5 se procede a sustituir los datos correspondientes en la ecuación 2, para finalmente quedar de la siguiente forma:

$$\frac{dP}{dt} = 6.6905 \left(1 - \frac{P}{115} \right) \quad (5)$$

La cual describe el crecimiento logarítmico del organismo expuesto a la concentración de 4 mg/L de oxitetraciclina correspondiente a la curva en color gris que se observa en el gráfico 2.

CONCLUSIONES

Las pruebas de ecotoxicología para la evaluación de la toxicidad de un efluente ya sea de origen farmacéutico y/o veterinario han demostrado ser útiles para caracterizar su riesgo y los posibles impactos en la calidad del ambiente, *D. magna* se considera el cladóceros de referencia para la evaluación de estos riesgos ecotoxicológicos en un ambiente acuático utilizando pruebas estandarizadas con dafnidos. Las respuestas a estos factores estresantes se ven reflejado en su crecimiento y reproducción, debido a que en estos casos el organismo utiliza una mayor cantidad de energía para hacer frente al estresor compensando el metabolismo basal dejando menos energía disponible para el crecimiento y la reproducción.

Las concentraciones útiles para el estudio de efectos crónicos a lo largo del desarrollo poblacional del organismo en estudio fueron identificadas, mismos que están correlacionadas con algunos previamente reportados.

El incremento de la concentración de oxitetraciclina provocó retardamiento en el tiempo en que se alcanza la estabilidad de la población, además de que no se logra alcanzar el número de individuos máximo que se identificó en los cultivos control.

Durante el estudio se observó que mayor concentración de oxitetraciclina, se desplaza el tiempo en el que se alcanza la madurez sexual y por lo tanto también la expulsión de neonatos.

Por lo tanto la presencia de oxitetraciclina en cultivos de *D. magna* afecta a nivel crónico su desarrollo poblacional, así como su madurez sexual, por lo tanto, será interesante identificar sus efectos a nivel celular y molecular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Avisar, D., Levin, G., & Gozlan, I. (2009). The processes affecting oxytetracycline contamination of groundwater in a phreatic aquifer underlying industrial fish ponds in Israel. *Environmental Earth Sciences*, 59(4), 939.
2. Boxall ABA, Kolpin DW, Halling-Sørensen B, Tolls J (2003) Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ Sci Technol* 37(15):286a–294^a.
3. Gallina, G., Poltronieri, C., Merlanti, R., & De Liguoro, M. (2008). Acute toxicity evaluation of four antibacterials with *Daphnia magna*. *Veterinary research communications*, 32(1), 287.
4. Hanazato T (2001) Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ Pollut* 112(1):1–10
5. Kim, H. Y., Lee, M. J., Yu, S. H., & Kim, S. D. (2012). The individual and population effects of tetracycline on *Daphnia magna* in multigenerational exposure. *Ecotoxicology*, 21(4), 993–1002.
6. Pereira-Maia, E.C.; Silva, P.P.; Almeida, W.B.; Santos, H.F.; Marcial, B.L.; Ruggiero, R.; Guerra, W. 2010. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quím. Nova*, v.33, p.700-706.
7. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65(5):725–759

AZÚCARES TOTALES EN ESPATAS DE TRES VARIETADES DE ALCATRAZ EN RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE FOSFITO

Nadia Issaí Torres-Flores¹, Libia I. Trejo-Téllez¹, Gabriel Alcántar-González¹, Fernando C. Gómez-Merino¹, Brenda I. Trejo-Téllez², Prometeo Sánchez-García¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ²Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. e-mail: nadia.torres@colpos.mx

RESUMEN

En esta investigación se evaluaron los efectos de la concentración de fosfito (Phi; 0, 0.075 y 0.150 mM), en la concentración de azúcares totales en espata de tres variedades de alcatraz (Gold Fever, Regal y Garnet Glow) en dos etapas del cultivo (reproducción y senescencia). Cada variedad tuvo tres tratamientos con cinco repeticiones y la unidad experimental fue un rizoma en una bolsa de polietileno negro con tezontle y agrolita como sustrato. El Phi fue adicionado a la solución nutritiva Steiner al 50%. Durante el ciclo de cultivo se realizaron tres riegos semanales de 200 mL por unidad experimental. En la etapa reproductiva, en plantas de las variedades Gold Fever y Garnet Glow se incrementó la concentración de azúcares cuando se trataron con 0.150 mM Phi. En la variedad Regal los azúcares se incrementaron con la dosis de 0.075 mM en fase reproductiva. En la fase de senescencia en la variedad Gold Fever no hubo presencia de espatas; mientras que, en las variedades Regal y Garnet Glow, la concentración de azúcares en espatas se incrementó con las aplicaciones de Phi. Se concluye que las aplicaciones de Phi tienen un efecto positivo en la concentración de azúcares en espatas de las tres variedades de alcatraz evaluadas, observándose una relación positiva entre la dosis de Phi y la concentración de azúcares.

INTRODUCCIÓN

La horticultura ornamental hace énfasis en la actividad de producción de flores, plantas y árboles, bajo alguna de las modalidades siguientes: invernadero, malla sombra o a cielo abierto. En nuestro país, la diversidad de climas permite el desarrollo de la producción de gran variedad de plantas de ornato, lo que hace posible que se tenga disponibilidad de flores en maceta durante todo el año o bien programar cultivos especiales para fechas de mayor demanda (Moran, 2004).

El fosfito (Phi) se está comercializado ampliamente para uso agrícola, ya sea como supresor de enfermedades o como fuente de P para la nutrición de los cultivos (McDonald *et al.*, 2001). El fosfito, tiene efectos directos e indirectos en el crecimiento de las plantas, por lo que se ha considerado un producto muy valioso en aplicaciones agrícolas (Danova-Alt *et al.*, 2008). Rickard (2000) reportó que el Phi aplicado vía foliar incrementa el rendimiento y mejora la calidad en varios cultivos.

Los carbohidratos, conocidos de manera general como azúcares, son los compuestos orgánicos más abundantes en la mayoría de las plantas; sus propiedades químicas y físicas varían de acuerdo a su composición, por lo que se han diseñado pruebas específicas para su detección, considerando que la fructuosa es el azúcar predominante, siendo la glucosa y sacarosa las de menor abundancia (Arenas *et al.*, 1995).

En el contexto anterior, este trabajo plantea como objetivo la evaluación de los azúcares solubles totales en espatas de tres variedades de alcatraz (Gold Fever, Regal y Garnet Glow), en dos etapas fenológicas reproductiva y senescencia, en respuesta al suministro de Phi en la solución nutritiva de Steiner.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los rizomas utilizados fueron de tres variedades de alcatraz de color (Gold Fever, Regal y Garnet Glow; obtenidos de la empresa Floraplant, ubicada en el Estado de Morelos, México).

Se empleó un sustrato a base de una mezcla de tezontle de 5-8 mm + Agrolita® (70/30, v/v), el cual fue depositado en bolsas de polietileno negro de 30 x 30 cm, donde se plantó un rizoma por bolsa; la cual fue considerada como una unidad experimental.

Previamente a la plantación se llevó a cabo una desinfección de los rizomas con la finalidad de evitar enfermedades fúngicas, con una solución de Cupravit® + Promyl® a razón de 2 y 1 g L⁻¹ de agua, durante 15 min, inmediatamente después se introdujeron los rizomas en una solución conteniendo 100 mg de ácido giberélico L⁻¹ durante 15 min para estimular la floración.

Durante esta investigación se evaluó la aplicación de tres concentraciones de fosfito (0, 0.075 y 0.150 mM), las cuales fueron suministradas en la solución nutritiva de Steiner al 50% (Steiner, 1984). El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento, independiente para cada variedad. La aplicación de los tratamientos se inició 15 días después de la plantación (ddp) de los rizomas, aplicando 200 mL de la solución nutritiva correspondiente por bolsa tres veces por semana. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (LSD, $P \leq 0.05$ %) empleando el software Statistical Analysis System (SAS, 2002).

Durante la etapa reproductiva y la de senescencia se obtuvieron las espatas de las tres variedades de alcatraz Gold Fever, Regal y Garnet Glow (**Figura 1**), donde se determinaron las concentraciones de azúcares solubles totales, utilizando como referencia el método descrito por Southgate (1976).

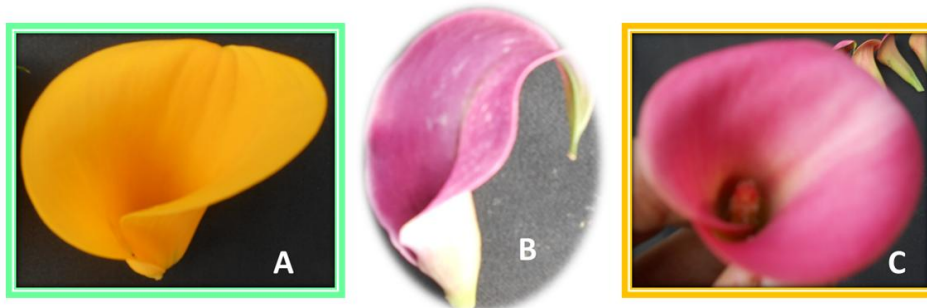


Figura 1. A) Espata Gold Fever, B) Espata Regal y C) Espata Garnet Glow, utilizadas para la determinación de azúcares solubles totales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la variedad Gold Fever en etapa reproductiva (Figura 2), la concentración de azúcares solubles totales se incrementa conforme se aumenta la concentración de Phi en la solución nutritiva. Con el tratamiento con 0.150 mM Phi, se incrementó en 69% la concentración de azúcares en espata, en comparación con el tratamiento sin Phi. En esta variedad no se tuvieron espatas en la etapa de senescencia.

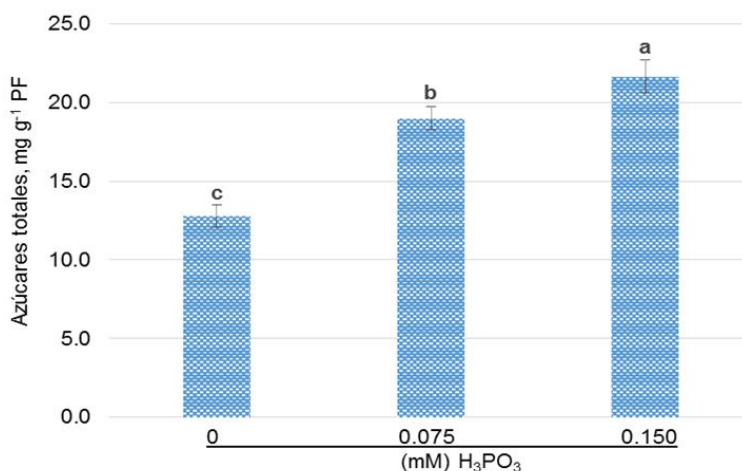


Figura 2. Concentración de azúcares solubles totales en espatas, en etapa reproductiva en la variedad Gold Fever. Medias \pm DE con letras distintas, indican diferencias estadísticas entre tratamientos (LSD, 0.05).

La concentración de azúcares en la variedad Regal en la etapa reproductiva no mostró diferencia estadística entre los tratamientos con Phi y el testigo; sin embargo entre niveles de Phi sí existió, observándose efectos negativos de la mayor dosis de Phi. Por el contrario, en etapa de senescencia, el tratamiento con 0.075 y 0.150 mM Phi incrementó la concentración de azúcares en espata en 31 y 38% respectivamente, en comparación con el testigo (Figura 3).

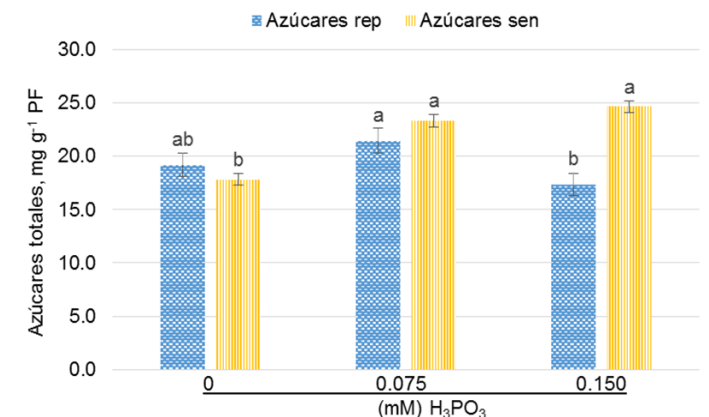


Figura 3. Concentración de azúcares solubles totales en espatas, en etapa reproductiva y de senescencia en la variedad Regal. Medias \pm DE con letras distintas en cada etapa fenológica, indican diferencias estadísticas entre tratamientos (LSD, 0.05).

En la variedad Garnet Glow en las dos etapas evaluadas la concentración de azúcares se incrementa al aumentarse la dosis de Phi, teniendo en ambos casos la mayor concentración de azúcares solubles totales en espatas con la máxima dosis de Phi en un 37 y 68% en fases reproductiva y de senescencia respectivamente, en comparación con el testigo (Figura 4).

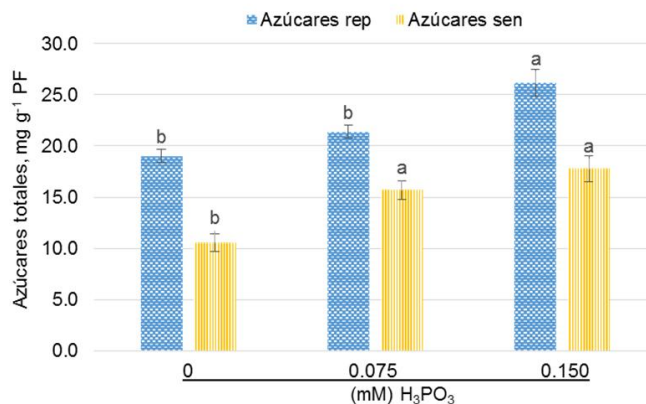


Figura 4. Concentración de azúcares solubles totales en espatas, en etapa reproductiva y de senescencia en la variedad Garnet Glow. Medias \pm DE con letras distintas en cada etapa fenológica, indican diferencias estadísticas entre tratamientos (LSD, 0.05).

CONCLUSIÓN

Se concluye que las aplicaciones de Phi tienen un efecto positivo en la concentración de azúcares solubles totales en espatas de las tres variedades de alcatraz evaluadas, observándose una relación positiva entre la dosis de Phi adicionadas a la solución nutritiva y la concentración de azúcares. Asimismo, es importante destacar que la concentración de azúcares se asocia de manera directa con la longevidad de la flor.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. E. McDonald; B. R. Grant; and W. C. Plaxton. Phosphite (phosphorous acid): Its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. 2001. 24: 1505-1519.
2. A. Steiner, "The universal nutrient solution", *in*: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. 1984. pp. 633-649.
3. D. A. Rickard. Review of phosphorus acid and its salts as fertilizer materials. J. Plant Nutr. 2000. 23: 161-180.
4. D. A. Southgate. Determination of food carbohydrates. Applied Science Publishers. LTD. London. 1976 105 p.
5. F. Moran Medina. Producción de plantas ornamentales en maceta en invernadero. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción Torreón, Coahuila, México, Octubre 13, 14 y 15. 2004. pp. 10-18.
6. L. Arenas; M. Marín; C. Castro y L. Sandoval. Determinación por HPLC de los azúcares en los frutos de guayaba (*Psidium guayaba* L.) de una plantación comercial del Municipio Mara. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 1995. 12(4): 467-483.
7. R. Danova Alt; C. Dijkema; P. De Waard. and M. Kock. Transport and Compartmentation of Phosphite in Higher Plant Cells-kinetic and ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Studies. Plant Cell Environ. 2008. 31:1510–1521.
8. SAS. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide. (Vol. 1 & 2). Cary, NC: SAS Institute Inc. Ver. 9). 2002. 652 p.

RECUPERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *lipbluv* DE *Bacillus licheniformis* UVAB01

Emmanuel Zumaya-Hernández, Gema Esmeralda Pérez-José, María Guadalupe Sánchez-Otero, Alfonso Alexander-Aguilera, Rodolfo Quintana-Castro*

Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. manuel.israel.1@hotmail.com
roquintana@uv.mx

RESUMEN

Las enzimas lipolíticas son moléculas de naturaleza ubicua por lo que se encuentran presentes prácticamente en todos los organismos. Su función primordial es la hidrólisis de triglicéridos; sin embargo, el interés biotecnológico está encaminado hacia su capacidad sintética. La búsqueda de genes de lipasas es de interés para estudios estructurales y de expresión en diversos sistemas biológicos. En el presente trabajo a partir de cepas recuperadas de aguas termales de San José Purua, Jungapeo, Michoacán se aisló una cepa identificada como *Bacillus licheniformis* a la cual se le denominó *Bacillus licheniformis* UVAB01. A esta cepa se le determinó actividad lipolítica a través de medios sólidos enriquecidos con rodamina B y aceite oleico. Se diseñaron oligonucleótidos a partir de secuencias reportadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para lipasas de *Bacillus licheniformis* (Gene Bank: KU984433.1 y KC663720.1) que permitieran la recuperación del gen de interés. Se obtuvo el DNA cromosómico por lisis química-enzimática, el cual fue utilizado como templado para amplificar el gen deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se determinó el tamaño del amplificado mediante geles de agarosa. El amplicón fue purificado y secuenciado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y se corroboró su identidad contra secuencias en la base de datos de NCBI. Como resultados se obtuvo un amplicón de 624 pb que al ser comparado mediante el programa BLAST arrojó una homología del 97% con genes reportados para lipasas de *Bacillus licheniformis*. A partir del gen se realizó la predicción de la estructura proteica observando un ORF de 208.a.a, mostrando homología con α/β hidrolasas, conformada por cinco hojas β en paralelo, rodeadas de cuatro hélices α . La triada catalítica mostró estar conformada por los aminoácidos Ser109, Asp161 e His184. Fue posible recuperar un gen codificante de una lipasa de *Bacillus licheniformis* UVAB01, lo que permitirá en trabajos futuros realizar la expresión de la proteína heteróloga.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas lipolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, en animales, plantas y microorganismos. Estas enzimas poseen una alta especificidad y velocidad de reacción y es por ese motivo que son atractivas para su aplicación industrial. Su función *in vivo* es catalizar la hidrólisis de enlaces ésteres de los triacilglicéridos, sin embargo el interés de las lipasas ha aumentado gracias a que presentan una actividad enzimática selectiva, estabilidad en disolventes orgánicos y la ventaja de síntesis en reacciones con una baja actividad de agua, esto debido a que las enzimas lipolíticas tienen un mecanismo de acción llamado activación interfacial que al encontrarse en un medio polar la estructura proteica denominada "tapa" encapsula a la enzima protegiéndola y dejándola actuar en la interfase del agua-aceite que se produce en una emulsión o en el caso de la síntesis en medios compuestos por disolventes orgánicos^{1,2}.

Una de las primeras fuentes para la obtención de lipasas fue a partir del páncreas de mamíferos y de semillas de plantas crucíferas, pero en la actualidad la mayoría se obtienen mediante la fermentación con microorganismos en biorreactores como lo son: hongos, bacterias y levaduras. La naturaleza es una amplia fuente que permite aislar nuevos microorganismos productores de lipasas⁴. Mediante métodos de identificación y aislamiento se han podido encontrar hongos, bacterias y levaduras, de los cuales destacan los del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Aspergillus*, y *Geotrichum*, por su capacidad de producir lipasas extracelulares. Debido al potencial de estas enzimas en procesos biotecnológicos diversas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de nuevos microorganismos productores de lipasas; dentro de estas son de especial interés las que se refieren a microorganismos productores de enzimas lipolíticas con características particulares de actividad. En este sentido los microorganismos alcalófilos y termófilos son de los más estudiados ya que sus lipasas son estables y tienen una función óptima a pH's alcalinos y a temperaturas elevadas, iguales o superiores a 50

°C, lo anterior siendo deseable dadas a las características de muchos de los procesos industriales que operan a temperaturas que exceden los 45 °C, por lo que es necesario encontrar lipasas que sean estables a estas temperaturas de reacción^{3, 4}. Se han aislado cepas de microorganismos del género *Bacillus sp* los cuales producen enzimas lipolíticas estables bajo condiciones alcalinas, lipasas de *B. subtilis* y *B. pumilis* tienen un interés en particular ya que muestran una estabilidad y actividad óptima en condiciones de pH alcalino extrema >9.5, las lipasas producidas por *B. thermocatenulatus* y *B. thermoleovorans* son termotolerantes, pero muestran una estabilidad moderada en pH's alcalinos y actividad máxima a pH entre 7.0-8.5. *Bacillus licheniformis* a pesar de ser un microorganismo mesófilo ha mostrado la presencia de al menos una lipasa que posee actividad óptima a temperaturas mayores a 50 °C y pH de 9.0^{5,6}

Las lipasas bacterianas recombinantes han cobrado gran interés en los últimos años debido a que poseen diversas ventajas tales como: su producción en medios con una baja exigencia nutritiva, son microorganismos generalmente fáciles de cultivar y de tiempo de generación reducido; además poseen un rango de sustratos lo cual les permite realizar reacciones de síntesis, hidrólisis o intercambio de grupos, sin generar subproductos.

Las lipasas recombinantes reportadas previamente de *B. licheniformis* muestra una actividad máxima a pH 10-11.5 y es notablemente estable a pH alcalino superior a 12, pero es medianamente termotolerante ya que presenta actividades entre los 50°C- 60°C^{5,7}.

Sin embargo, para la generación de este tipo de enzimas el primer paso es la recuperación y caracterización de los genes que codifican para estas proteínas, de esta manera poder analizar la secuencia de nucleótidos y evaluar *in silico* diversas características como son: peso molecular, punto isoeléctrico, estructuras proteicas, posición del sitio activo y otros motivos relacionados con las lipasas.

Por ello el objetivo del presente trabajo fue la recuperación y caracterización molecular del gen que codifica para una lipasa denominado *lipbluv* a partir de la cepa de *Bacillus licheniformis* UVAB01 aislado de la fuente de aguas termales de San José Purua, Jungapeo, Michoacán.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivación y crecimiento.

Para la reactivación de la cepa se partió de cultivos preservados a -80 °C en glicerol al 30%, a partir de estos se tomaron 10 µL y se inocularon en agar Luria Bertani (LB). Las cajas de Petri se incubaron por 24 h a 37°C. A partir de las cepas reactivadas en agar LB se realizaron inóculos en medios de cultivo LB líquidos y se incubaron en agitación a 50 °C a 100 rpm por 24 h.

Extracción de DNA Cromosómico de Bacillus licheniformis UVAB01.

A partir de cultivos en medio líquido se recuperó el paquete celular por centrifugación a 16 000 x g, Al paquete celular se le adicionó 1 mL de buffer de resuspensión celular (50mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA), Las células se mantuvieron a -20 °C por 10 min, posterior a la incubación se adicionaron 100 µL del buffer de lisis (250mM Tris pH8.0, 10mg/ml lisozima) y se incubó en hielo por 45 min, al término se adicionaron 200 µL del buffer de lisis 2 (0.5% SDS, 50mM Tris pH 7.5, 0.4M EDTA, 1 mg/ml de proteinasa K), se llevó a incubación a 50 °C y se mantuvo por 60 min, al término del tiempo se adiciono 1.2 mL de fenol equilibrado se centrifugó a 10,000 x g por 15 min a 4 °C, se transfirió el sobre nadante a un tubo nuevo y se adicionó 0.1 vol de acetato de sodio 3M. Se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo por 10 minutos. Posterior a la incubación, el sobrenadante se centrifugo a 16,000 x g por 15 min y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo. La precipitación del DNA se realizó mediante la adición de 1 volumen de isopropanol y se incubo a -20 °C por 1 hora. El DNA precipitado se recuperó por centrifugación a 13,000 x g por 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el DNA con etanol al 75% frío volumen-volumen. Finalmente se centrifugo el DNA a 16,000 x g por 10 min, se decantó el sobrenadante y se secó la muestra. El DNA se resuspendio en 30 µL de agua Mili Q y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Diseño de oligonucleótidos

A partir de una secuencia conocida del gen de lipasa para *Bacillus licheniformis* (Gene Bank: KU984433.1 y KC663720.1) reportada en la base de datos del National Center For Biotechnology Information (NCBI), se realizó el diseño de los oligonucleótidos. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron diseñadas incluyendo en los extremos 5' los sitios de restricción Nde I y Bam HI con la finalidad de realizar la posterior clonación en el vector pET-3B. Para verificar el correcto

alineamiento de los oligonucleótidos con la secuencia de interés estos fueron comparados contra la base de datos del NCBI mediante el programa BLAST⁸, se analizó la ausencia de formación de dímeros y horquillas de los oligonucleótidos mediante el programa OligoAnalyzer 3.1 y se comprobó la amplificación *in silico* del gen de la lipasa utilizando el programa SerialCloner 2.6.1.

Amplificación del gen *lipbluv*

Utilizando el DNA cromosómico de *Bacillus licheniformis* UVAB01 se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los oligonucleótidos diseñados previamente. La reacción se llevó a cabo mediante el equipo C1000™ Touch Thermal Cycler Bio-Rad. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo único de 1 minuto a 94 °C, 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minutos a 57 °C y 1 minuto y 30 segundos a 72 °C y un ciclo único final de 5 minutos a 72 °C. La T_m de la reacción fue calculada de acuerdo a la regla de Wallace 1979. Los productos de PCR fueron mantenidos a -20 °C hasta su posterior uso.

Purificación y cuantificación del producto de PCR

Se realizó la purificación de los productos de PCR mediante el kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" de la empresa Promega. Para al término del protocolo se realizó una electroforesis en agarosa para corroborar la purificación del producto de PCR.

Los productos de purificados se cuantificaron mediante un equipo NanoDrop® ND 2000 de la compañía Thermo Scientific™, con las relaciones de absorbancia de 260 nm para concentración y 260/280 nm para las relaciones de pureza donde absorbancias de 1.9-2.0 corresponden a muestras con alta pureza.

Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar la correcta amplificación de los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1% utilizando buffer TAE 1X (Tris 40 mM Ácido acético 20 mM, EDTA 1mM) y 3 µL de bromuro de etidio a 10mg/mL. Los geles fueron corridos a 95 V por periodos de 35 minutos y analizados mediante el equipo Gel Doc™ System Bio Rad. Para corroborar el correcto tamaño del amplicon las muestras de PCR fueron corridas con marcadores de 1 Kb.

Análisis Bioinformáticos

Para el análisis de la secuencia se utilizó el programa SerialCloner 2.6.1 que permitió la identificación de la secuencia primaria y la predicción del marco abierto de lectura correspondiente de la lipasa *LipBLUV*. Para la generación del modelo teórico de la estructura secundaria utilizó el portal SWISS-MODEL⁹ (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) y para la predicción de la estructura terciaria se realizó a través del portal web RaptorX¹⁰ (<http://raptorx.uchicago.edu>). La predicción del perfil hidrofóbico se realizó de acuerdo con la escala reportada por Kyte & Doolittle a través del portal ProtScale del sitio web ExPASy Bioinformatics Portal (<https://www.expasy.org>) y el peso molecular y punto isoeléctrico se realizó mediante el portal ComputeI/Mw.

RESULTADOS.

A partir de las reacciones de PCR se obtuvo un amplicón con un tamaño de 624 pb, que al compararlo con la base de datos del NCBI BLAST arrojó una homología del 99% para lipasas para *Bacillus licheniformis*. Figura 1.

Query	1	100	200	300	400	500	600
Bacillus licheniformis strain IBRL-CHS2 lipase gene, complete cds	1099	1099	97%	0.0	99%	KU984433.1	
Bacillus licheniformis WX-02 genome	1099	1099	97%	0.0	99%	CP012110.1	
Bacillus licheniformis ATCC 14580, complete genome	1099	1099	97%	0.0	99%	CP000002.3	

Figura 1. Resultado del alineamiento del amplicon correspondiente al gen *lipbluv*. Se observa el alineamiento con una identidad del 99% y con una cobertura de la secuencia de referencia del 97%.

De acuerdo con la predicción obtenida de la estructura primaria se determinó que la lipasa posee un total de 208 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 22229 Da y un punto isoeléctrico de

9.3. Se observó que la secuencia de aminoácidos corresponde a la forma canónica de la súper familia de hidrolasas, figura 2. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos la lipasa LipBIUV muestra sitios conservados para triacilglicerol esterases y lipasas de la clase 2.

a)

```

GG AAT CCC TTG CGT CGC CAT TCA TTT TTA TCT ATT CTA TTG ATT TGC ATG CTG TCT GTT GTG TCC GTA TTT TCG TTC CGG CCT TCA GCA GCT TCC GCC GC < 100
N P L R R H S F L S I L L I C M L S V V S V F S F R P S A A S A A
CC TTA GGG AAC GCA GCG GTA AGT AAA AAT AGA TAA GAT AAC TAA ACG TAC GAC AGA CAA CAC AGG CAT AAA AGC AAG GCC GGA AGT CGT CGA AGG CGG CG

T TCC CAC AAT CCG GTC GTC ATG GTC CAC GGC ATC GGC GGA GCC GAT TAT AAC TTC ATC GGC ATT AAA TCG TAT TTA CAA TCT CAA GGC TGG ACA AGC AGT < 200
S H N P V V M V H G I G G A D Y N F I G I K S Y L Q S Q G W T S S
A AGG GTG TTA GGC CAG CAG TAC CAG GTG CCG TAG CCG CCT CGG CTA ATA TTG AAG TAG CCG TAA TTT AGC ATA AAT GTT AGA GTT CCG ACC TGT TCG TCA

GAG CTT TAC GCC ATC AAC TTT ATC GAT AAA ACG GGA AAT AAT ATA AAC AAT GCT CCG AGA TTA TCC GAA TAC ATC AAG CGT GTG CTG AAT CAA ACA GGA G < 300
E L Y A I N F I D K T G N N I N N A P R L S E Y I K R V L N Q T G A
CTC GAA ATG CCG TAG TTG AAA TAG CTA TTT TGC CCT TTA TTA TAT TTG TTA CGA GGC TCT AAT AGG CTT ATG TAG TTC GCA CAC GAC TTA GTT TGT CCT C

CA TCA AAA GTC GAT ATT GTC CCC CAC AGC ATG GGC GGG GCC AAT ACG CTC TAT TAT ATT AAA AAT CTG GAT GGC GCG GAT AAA GTC GGA CAT GTC GTC AC < 400
S K V D I V A H S M G G A N T L Y Y I K N L D G A D K V G H V V T
GT AGT TTT CAG CTA TAA CAG CCG GTG TCG TAC CCG CCC CGG TTA TGC GAG ATA ATA TAA TTT TTA GAC CTA CCG CGC CTA TTT CAG CCT GTA CAG CAG TG

C CTT GGG GGC GCT AAT CGT CTC GTT ACA AAC ACG GCG CCT CAG AAT GAC AAA ATC TCA TAC ACT TCG ATT TAC AGC ACA AGC GAC TAT ATC GTC TTA AAC < 500
L G G A N R L V T N T A P Q N D K I S Y T S I Y S T S D Y I V L N
G GAA CCC CCG CGA TTA GCA GAG CAA TGT TTG TGC CCG GGA GTC TTA CTG TTT TAG AGT ATG TGA AGC TAA ATG TCG TGT TCG CTG ATA TAG CAG AAT TTG

AGC CTC TCC AAA CTT GAT GGT GCA AAC AAT GTG CAA ATC TCA GGC GTA AGC CAT GTC GGT CTT TTG TTC AGC AGC AAA GTA AAT GCC TTG ATT AAA GAC G < 600
S L S K L D G A N N V Q I S G V S H V G L L F S S K V N A L I K D G
TCG GAG AGG TTT GAA CTA CCA CGT TTG TTA CAC GTT TAG AGT CCG CAT TCG GTA CAG CCA GAA AAC AAG TCG TCG TTT CAT TTA CGG AAC TAA TTT CTG C

GG CTG ACC GTC ACG GGG ATC CCG A < 624
L T V T G I P X
CC GAC TGG CAG TGC CCC TAG GGC ¶

```

b)

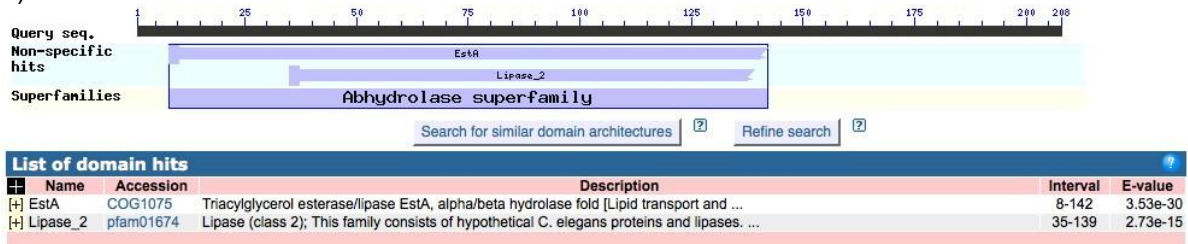
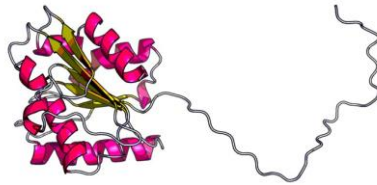
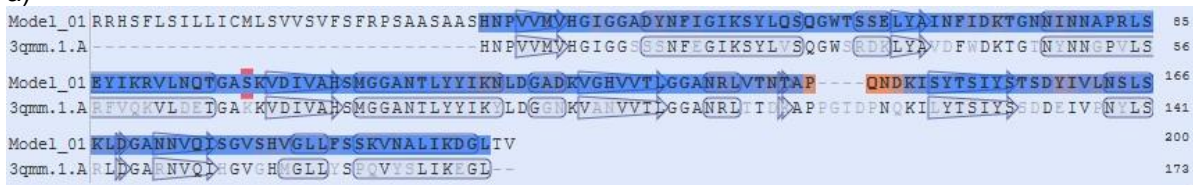


Figura 2. Estructura primaria de la lipasa LipBIUV y análisis de la comparación contra secuencias reportadas. a) Secuencia de aminoácidos predicha para la lipasa LipBIUV. b) Análisis de la comparación de la secuencia de la lipasa LipBIUV contra las secuencias de la base de datos del NCBI. Se observa que la predicción de la proteína predicha muestra dominios conservados para la súper familia de α/β hidrolasas.

La predicción de la estructura secundaria y terciarias mostró que la lipasa LipBIUV posee una estructura conformada por alrededor de cinco hojas β en paralelo, rodeadas de cuatro hélices α . Figura 3. La triada catalítica se predijo por comparación con secuencias conservadas de acuerdo a lo reportado por Nthangeni *et al.*, 2001 esta mostró estar conformada por los aminoácidos Ser109, Asp161 e His184.

a)



b)

Figura 3.-Prediccion de las estructuras secundarias y terciarias de la lipasa LipBIUV. a) Estructura secundaria de la lipasa LipBIUV donde se observan 5 hélices α y 4 hojas β . b) La estructura terciaria muestra la posición de las hojas β en paralelo rodeadas por hélices α .

El cálculo de la hidrofobicidad de la lipasa LipBIUV muestra una región comprendida entre los aminoácidos 100 al 110, figura 4, que podrían estar relacionados con región denominada "tapa" reportada para las lipasas y que permite la activación interfacial típica de estas enzimas.

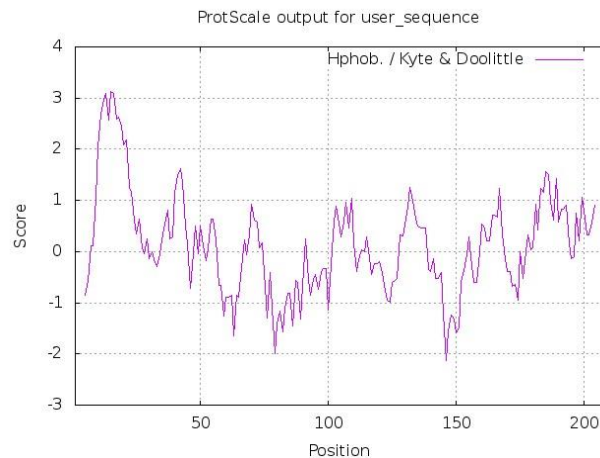


Figura 4.- Gráfica de hidrofobicidad de la lipasa LipBIUV. Se observa una región entre los aminoácidos 100 al 110 con un patrón de hidrofóbico que pudiera estar relacionado con la región conservada de la tapa.

CONCLUSIONES.

A partir de una cepa de *Bacillus licheniformis* UVAB01 aislada de aguas termales de San José Purua, Jungapeo, Michoacán, México fue posible recuperar un gen denominado *lipbluv* de 624 pb y que codifica para una lipasa denominada LipBIUV conformada por 208 aminoácidos, esta lipasa mostró tener un peso molecular de aproximadamente 22.2 KDa y un perfil hidrofóbico que muestra una región comprendida entre los aminoácidos 100 al 110 y que podría estar relacionada con la presencia

del motivo denominado “tapa” y que está presente en diferentes lipasas, esta región se activa en la interfase agua-aceite y permitiendo el acceso de los sustratos correspondientes para la acción catalítica de la enzima. La predicción de las estructuras proteicas primaria, secundaria y terciaria mostraron que la lipasa LipBIUV presenta motivos conservados de la súper familia de α/β hidrolasas y para los aminoácidos que conforman a la triada catalítica Ser109, Asp161 e His184, además de que mostró poseer el pentapéptido conservado AHSMG equivalente al pentapéptido GX SXG reportado por Jaeger *et al.*, 1994 en la estructura canónica de las lipasas.

BIBLIOGRAFÍA

1. An. Vet. (Murcia) 28: 45-65 (2012). Propiedades de enzimas lipolíticas bacterianas y aplicaciones. Navarro-González, I. Et Al2.
2. Hasan, F., Shah, A. and Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), pp.235-251.
3. Gagandeep Kaur, A. S. (2016). Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India, 1-10.
4. J. Gomes and W. Steiner: Extremophiles and Extremozymes, Food Technol. Biotechnol. 42 (4) 223–235 (2004)
5. Nthangeni, M. B., Patterton, H. G., van Tonder, A., Vergeer, W. P., & Litthauer, D. (2001). Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and microbial technology*, 28(7-8), 705-712.
6. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., ... & Ehrenreich, A. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 7(4), 204-211.
7. Madan, B., & Mishra, P. (2009). Overexpression, purification and characterization of organic solvent stable lipase from *Bacillus licheniformis* RSP-09. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 17(3), 118-123.
8. Blast.ncbi.nlm.nih.gov. (2018). *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. [online] Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
9. Swissmodel.expasy.org. (2018). *SWISS-MODEL*.
10. Morten Källberg, Haipeng Wang, Sheng Wang, Jian Peng, Zhiyong Wang, Hui Lu & Jinbo Xu. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* 7, 1511–1522, 2012.
11. Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS microbiology reviews*, 15(1), 29-63.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA *IN VITRO* DE PRODUCTOS DE CONTROL BIOLÓGICO Y BIORRACIONALES FRENTE A *Fusarium oxysporum*

Araceli Nieto Cortez^{1,2}, J. Guadalupe Callela Hernández¹, María de la Luz Rojas Sanchez¹, Douglas Rodríguez Martínez¹

¹Investigación Aplicada, Driscoll's México; ²Instituto Tecnológico José Mario Molina Pasquel y Henriquez, Tamazula de Gordiano, Jalisco, México.

RESUMEN

En los últimos años, los cultivos de *berries* han sido afectados por *Fusarium oxysporum*. La gravedad de la enfermedad conduce a la muerte de plantas ocasionando pérdidas económicas, por lo que se han implementado métodos de control, que ayudan a combatir este problema, sin obtenerse los resultados deseados. En el presente trabajo se llevó a cabo un ensayo para evaluar la eficacia de 19 productos biorracionales y biológicos, disponibles comercialmente y/o en fase de investigación desarrollo (hongos, bacterias y biorracionales) respecto a la inhibición *in vitro* de cuatro aislados de *F. oxysporum*, procedente de diferentes zonas de Jalisco y Michoacán donde causan marchitez vascular, específicamente en plantas de zarzamora (*Rubus* L. sub. *Rubus*) y Fresa (*Fragaria x ananassa*). El enfrentamiento dual de los productos biológicos a *F. oxysporum*, mostró diferencias significativas en varios de los casos. El Sanosil® mostró mejores resultados con 100% de inhibición del crecimiento micelial en los cuatro aislados del patógeno, seguidos por A5030 y 383, con 69% y 75% de inhibición, respectivamente. Th-L6®, Rhizobac combi®, Bioderma® y Tk Root®, mostraron resultados moderados, mientras que los restantes productos mostraron porcentajes de inhibición inferiores al 30%, lo que indica que no fueron eficientes para el control del patógeno. A partir de estos resultados se realizarán evaluaciones *in vivo* con los productos que resultaron más eficientes a fin de evaluar su posible uso en los sistemas de producción de fresa y zarzamora en campo.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por fitopatógenos causan pérdidas severas en la agricultura (Rey *et al.*, 2000). Estas mermas consisten en la reducción de la calidad y/o la cantidad de la cosecha obtenida (Monte, 2001). Además de esto, algunos otros ocasionan daños que alteran el crecimiento y desarrollo de las plantas hospederas atacadas por estos microorganismos, pudiendo llegar a causar la muerte de las plantas (Agrios, 2005).

México es uno de los principales exportadores de *berries* frescas en el mundo, las cuales son provenientes en su mayoría de los estados de Michoacán, Jalisco, Baja California y Guanajuato (SIAP, 2017). La producción de estas frutillas, principalmente zarzamora (*Rubus* L. sub. *Rubus*) y Fresa (*Fragaria x ananassa*) ha decaído en los últimos años debido a la presencia de la Marchitez Vascular, enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* (Gordon *et al.*, 2016) en el caso de la zarzamora y *F. oxysporum* f. sp. *Fragariae* (Ochoa y Fonseca, 2000). Quillay (2011) menciona que la marchitez vascular puede causar pérdidas del 50 a 100% en la producción de plántulas y 50% en la producción de frutas.

Algunas especies del género *Fusarium* spp. son habitantes del suelo. Se reconocen por su impacto económico negativo en la agricultura mundial, ya que son agentes causales del marchitamiento vascular y pudrición basal de una gran variedad de plantas de importancia agrícola. *F. oxysporum* f. sp. *mori*, constituye uno de los factores más limitantes para la producción de zarzamora en México y California, ocasionando la muerte de plantas infectadas en cualquier etapa del cultivo (Gordon *et al.*, 2016).

Desafortunadamente no existen medidas de control eficientes para el manejo integrado de esta enfermedad. El esfuerzo de los productores por manejar esta problemática los ha conducido a la búsqueda de alternativas de manejo, debido fundamentalmente al bajo control que presenta el uso de fungicidas sintéticos. Sumado a esto, las múltiples aplicaciones de dichos agroquímicos pueden acarrear diferentes problemas, entre los que destacan la toxicidad en humanos (Paulitz y Bélanger, 2001; Whalen *et al.*, 2003), detenciones de exportaciones por residuos químicos en productos, daños al medio ambiente (Ramírez y Jacobo, 2002), así como efectos perjudiciales en organismos benéficos (Anderson *et al.*, 2003). Más aún, los fitopatógenos podrían desarrollar resistencia a ingredientes activos de los fungicidas sintéticos, requiriendo el uso de altas dosis y la búsqueda de

nuevas formulaciones para reemplazar a los que han inducido resistencia en hongos (Bajwa *et al.*, 2003; Chapagain *et al.*, 2007).

Debido a la problemática que presenta el uso indiscriminado de los fungicidas sintéticos, así como el interés de la compañía en ampliar las producciones orgánicas, es necesario implementar alternativas naturales para el control de enfermedades. De ahí que este trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia y consistencia de productos de control biológico y biorracionales en la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *F. oxysporum*.

PARTE EXPERIMENTAL

Selección de aislados y preparación de inóculo de *Fusarium oxysporum*

La Tabla I muestra los cuatro aislados de *F. oxysporum* usados en este estudio, provenientes de distintas zonas de los estados de Jalisco y Michoacán, que fueron previamente identificados hasta especie mediante amplificación y secuenciación de regiones ITS del rDNA, Factor de elongación 1- α y β -tubulina; así como evaluada su Patogenicidad en plántulas de zarzamora var. 'Tupy' (datos no publicados).

Tabla I. Aislados de *F. oxysporum* utilizados para la evaluación de la eficacia de productos biológicos y biorracionales.

Aislado	Procedencia		Patogenicidad
	Cultivo	Zona/ Estado	'Tupy'
Mx-Black 719	Zarzamora	Cd. Guzmán, Jal.	+
Mx-Straw 852	Fresa	Zamora, Mich.	-
Mx-Black 870	Zarzamora	Los Reyes, Mich.	+
Mx-Black 872	Zarzamora	Los Reyes, Mich.	-

La suspensión de esporas se obtuvo a partir de un cultivo en PDA (7 días de crecimiento) de cada aislado de *F. oxysporum* a evaluar. La remoción de esporas se realizó adicionando 1 ml de agua destilada estéril en un tubo Eppendorf de 2 ml, con ayuda de una aza de Drigalsky estéril se removió sobre la superficie del medio, obteniendo de esta forma la solución madre con un recuento de 10^6 conidios/ml. 40 μ l de la solución de esporas obtenida, fueron colocados y esparcidos con auxilio de una espátula de Drigalsky en medio PDA, e incubados a 25°C en oscuridad por siete días. A partir de estos cultivos fueron tomados, con ayuda de un sacabocados estéril, discos de 5 mm de diámetro que fueron usados como inóculo del patógeno en todas las pruebas.

Productos de control biológico

Se utilizaron productos de distintos orígenes: microorganismos (bacterias y hongos antagónicos), extractos de plantas y biorracionales (ácidos orgánicos y minerales); con diferentes modos de acción (tabla II).

Tabla II. Productos comerciales y/o en fase de estudios probados como posibles agentes de control biológico y biorracional de *F. oxysporum*.

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis
Silikare®	Silicato de potasio	3.125 ml/250 ml PDA
Sanosil®	Peróxido de hidróxido+plata	1ml/250ml PDA
Biozid agroX®	Solución ácido hipocloroso	10ml/250ml PDA
Progranic Mega®	Extracto de gobernadora	1.36ml/250ml PDA
Trylogy®	Extracto de Neem	4.375ml/250ml PDA
Prot -1*	<i>Streptomyces</i> spp.	125 ml/250 ml PDA
Prot -2*	<i>Streptomyces</i> spp.	125 ml/250ml PDA
A5030*	<i>Streptomyces</i> spp.	NA
383*	<i>Streptomyces</i> spp.	NA
Methazar®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.12g/250 ml PDA
Bioderma®	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.1g /250 ml PDA
Th-L-6®	<i>T. harzianum</i>	5g /250 ml PDA
Trianum®	<i>T. harzianum</i>	0.1g/250 ml PDA
Javelin®	<i>Bacillus thuringensis</i>	0.78g/250 ml PDA
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i>	3.125ml/250 ml PDA
Actinovater®	<i>Streptomyces lydicus</i>	0.148g/250 ml PDA
Alibio Bpg Plus®	Compuesto de microorganismos	0.08g/250 ml PDA
Rhizobac combi®	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>Mycoides</i> , <i>B. megatherium</i> y <i>B. subtilis</i>	0.14g/250 ml PDA
Tk Root®	<i>T.harzianum</i>	0.14g/250 ml PDA

*Productos que aún no están disponibles comercialmente; ^{NA} no aplica.

Adicionalmente se utilizó como testigo positivo Carbendasal® (Metilbenzimidazol-2-ilcarbamato), fungicida químico que inhibe el crecimiento del hongo; y como testigo negativo agua destilada estéril.

Enfrentamientos *in vitro*

Todos los enfrentamientos se realizaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo 20 ml de PDA en condiciones controladas (22±2°C, 12 horas luz). De cada tratamiento y para cada aislado de *F. oxysporum* se tuvieron tres réplicas y todo el experimento fue repetido dos veces. Los bioplaguicidas se prepararon considerando las dosis recomendadas en campo (DRC).

Metodología agar envenenado para extractos y biorracionales

Para la preparación de las concentraciones, se calcularon las cantidades necesarias de los agentes antifúngicos (Silikare®, Sanosil®, Biozid agroX®) y extractos (Gobernadora y Neem), tomando en cuenta la DRC y aforando en agar PDA a 45-55°C (Quintero, 1997). En el centro de las cajas de Petri que contenía las respectivas dosis (Tabla II) incorporadas en el medio de cultivo, se colocó un disco (5 mm de diámetro) del inóculo del patógeno de cada aislado (fig. 1A) (Achicanoy, 1991). La determinación de la inhibición del crecimiento de la colonia se realizó mediante la fórmula utilizada por Pastrana (2014).

$$\text{Formula I. Actividad Antifúngica (\%)} = [(Dc - Ds) / Dc] \times 100$$

Donde Dc es el diámetro de crecimiento de la placa control (Blanco) y Ds el diámetro de crecimiento en la placa que contenía el agente antifúngico probado.

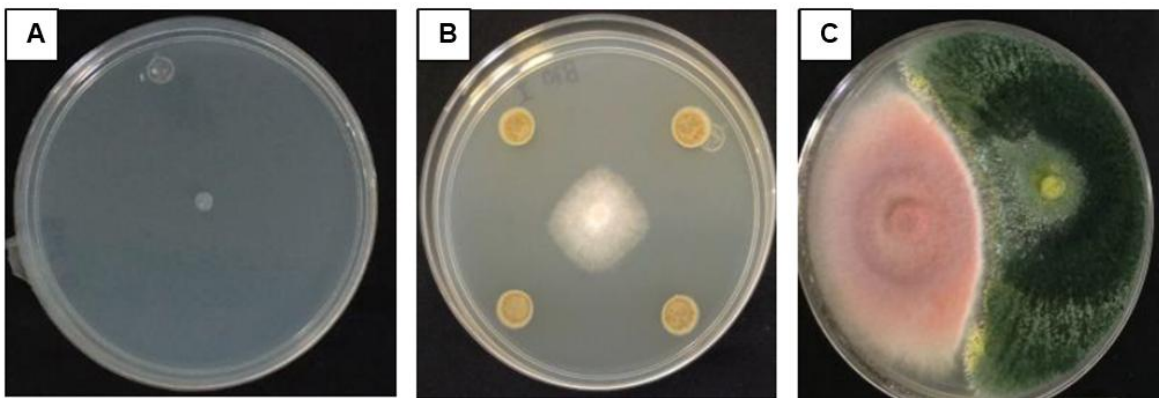


Figura 1. Métodos de evaluación de diferentes productos como inhibidores del crecimiento micelial de *F. oxysporum* en medio PDA. (A) medio envenenado con extractos vegetales y biorracionales, (B) bacterias antagonicas, (C) hongos de control biológico.

Metodología de enfrentamientos con bacterias antagonicas

Para evaluar la actividad antagonista de los productos a base de *Bacillus* spp., *Streptomyces lydicus* y el compuesto de microorganismos, se colocó en el centro de cada placa un disco de 5 mm con micelio del patógeno. Después de 48 h, cuatro gotas de 50 μ l de la suspensión bacteriana de los productos se situaron equidistantemente en el borde de la placa (fig 1B). Posteriormente, las placas se incubaron durante 7 días bajo las condiciones antes descritas y se calculó el % IRC (porcentaje de inhibición del crecimiento micelial) mediante la siguiente fórmula

$$\text{Fórmula 2. \%IRC} = [(D1-D2)/D1] \times 100$$

Donde D1 es crecimiento micelial y D2 es crecimiento micelial influenciado (Patiño *et al.*, 2001).

Metodología de enfrentamientos duales con hongos benéficos

40 μ l de la solución diluida en la placa (PDA) (Tabla II), fueron esparcidos con un asa de Drigalsky y posteriormente incubados por siete días bajo las condiciones antes descritas (Quintero, 1997).

Una vez que los hongos benéficos desarrollaron micelio de manera uniforme por toda la placa, se tomaron, con auxilio de un sacabocados estéril, discos de 5 mm de diámetro, los cuales fueron colocados (uno en cada placa) frente al disco del patógeno, que había sido colocado 48 horas antes a 2.5 cm de la periferia de la placa (fig. 1C). Las placas se incubaron por 7 días a condiciones controladas antes mencionadas. Al finalizar la incubación se determinó el porcentaje de inhibición radial del crecimiento (% IRC) del patógeno mediante la fórmula de Royse y Ries (1978).

$$\text{Fórmula 3. \%IRC} = [(R1-R2)/R1] \times 100$$

Donde R1 es el radio mayor y R2 es el radio menor desde el disco hasta el punto donde el patógeno y el antagonista se ponen en contacto respectivamente.

Metodología para productos a base de streptomyces spp.

Para evaluar la efectividad de los productos a base de *Streptomyces* spp. (Prot-1 y Prot-2), no disponibles comercialmente porque se encuentran en fase de investigación, se siguió la metodología propuesta por la empresa desarrolladora de estos productos. Se tomó una relación de dilución 1/200 en base al medio de cultivo, por lo que en este caso se tomaron 125 μ l del producto y se esparcieron con un asa de Drigalsky sobre la placa, se dejaron reposar hasta la absorción de éste por el medio (aproximadamente 1 hora). Posteriormente se colocó un disco conteniendo el patógeno. Las condiciones de incubación y la evaluación fueron similares a la metodología antes descrita.

Los productos A5030 y 383 se recibieron como siembras microbianas (cepas de *Streptomyces* spp. en placas con PDA), por lo que para obtener el inóculo, se sembraron cepas de estos productos en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio Agar Diferencial de Moho de Levadura (YMD) y se incubaron

a 30°C por 4 días. Posteriormente se tomaron 200 µl del medio conteniendo el inóculo y se colocaron en una placa con medio PDA, distribuyéndose con auxilio de un asa de Drigalsky estéril. Las placas fueron incubadas con el tiempo y condiciones antes mencionadas. Posteriormente, se vertieron 4 ml de agua destilada estéril en la placa y con un asa de nicromo se resuspendieron las esporas. Con ayuda de una micropipeta se tomó la solución y se colocó en un tubo Eppendorf® estéril de donde se realizó el conteo de esporas con ayuda de una cámara de Neubauer, para ajustar la suspensión a una concentración de 10^5 esporas /ml. Para el ensayo, se colocaron 100 µl de la suspensión de esporas de *B. cinérea* y se esparcieron por toda la caja con PDA. Seguidamente se situaron 4 gotas de 10 µl de la suspensión de esporas de los productos a evaluar en la parte periférica a la placa, se dejaron incubar durante 8 días a condiciones ya mencionadas y se evaluó el crecimiento micelial siguiendo la fórmula anterior.

Análisis de datos.

Para el análisis de los datos obtenidos de la inhibición del crecimiento fúngico se realizó un análisis de varianza y cuando existieron diferencias significativas, se utilizó la separación medias (prueba HSD de Tukey) para determinar el valor del error estándar. Todos los cálculos se realizaron utilizando el paquete estadístico JMP (versión 13.0, SAS Institute Inc.). $\alpha=0.05$ y un grado de correlación $r^2>0.80$.

RESULTADOS

Inhibición de crecimiento general

La (fig. 2) muestra los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* considerando todos los aislados, para cada uno de los productos evaluados. De manera general Sanosil® (Peróxido de hidrógeno + plata) fue el único producto que presentó porcentajes de inhibición de 100% y fue estadística superior al resto. Los productos 383, A5030 (*Streptomyces* spp.) y Progranic Mega® (Extracto de Gobernadora) ofrecieron porcentajes de inhibición entre 60 y 70%, sin diferencias estadísticas entre ellos. Los productos a base de *T. harzianum* (Bioderma®, ThL-6® y TK Root®) así como Rhizobac combi (*B. cereus*) mostraron porcentajes de inhibición entre 50 y 60%, sin diferencias estadísticas entre ellos. Los restantes productos resultaron menos eficaces con porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* inferiores al 50%.

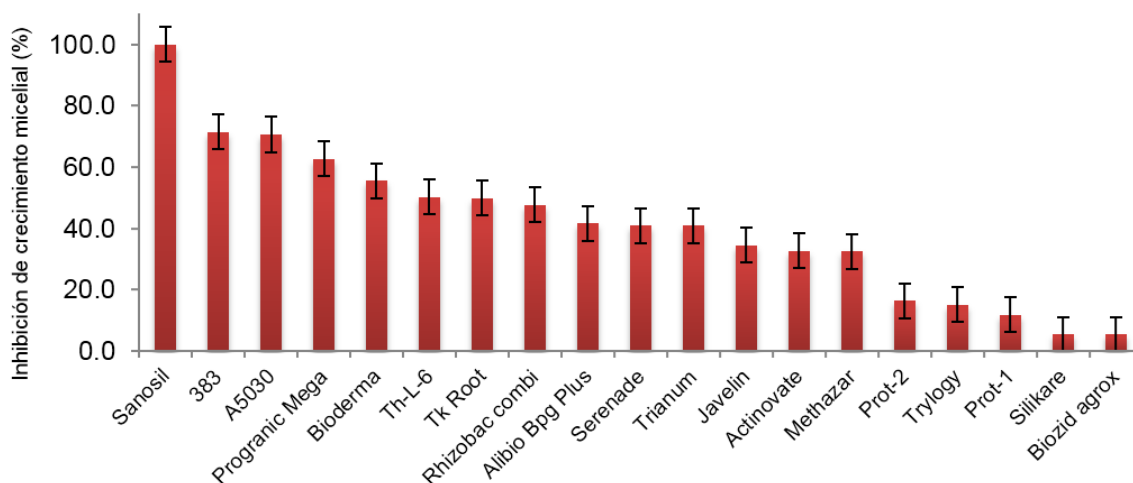


Figura 2. Efectividad de diferentes biofungicidas y productos biorracionales como inhibidores del crecimiento micelial de aislados de *F. oxysporum in vitro*.

Inhibición de crecimiento por aislado

El aislado Mx-Black 719 (fig. 3) proveniente de zarzamora, no fue inhibido por los productos Silikare®, Biozid agrox® y Trylogy®, teniendo un porcentaje de inhibición por debajo de 20%. Los productos que mejores resultados de inhibición ofrecieron fueron Sanosil®, 383 y A5030, seguidos de Progranic Mega®, Rhizobac Combi® y Tk Root®.

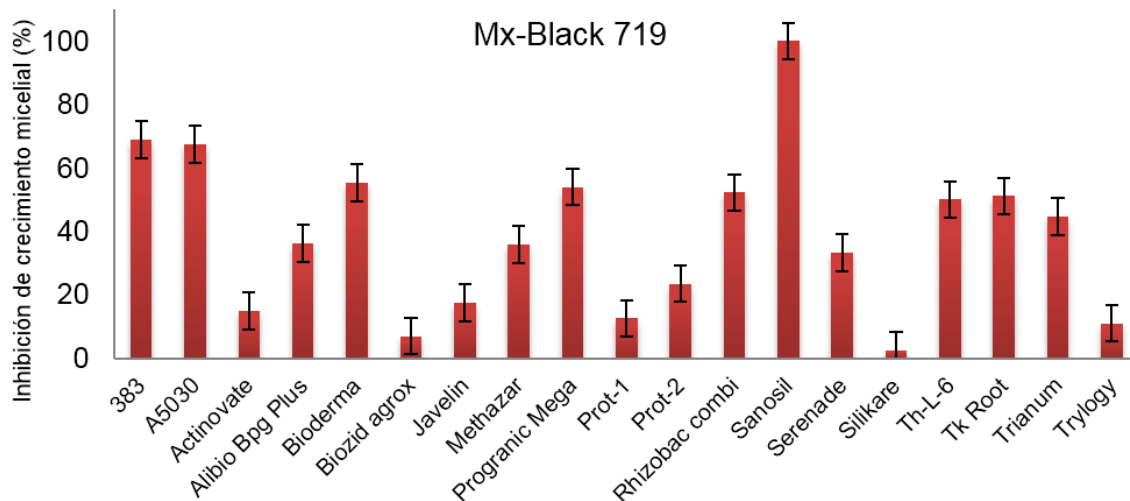


Figura 3. Efectividad de diferentes biofungicidas y productos biorracionales como inhibidores del crecimiento micelial *in vitro* del aislado de *F. oxysporum* Mx-Black 719, procedente de zarzamora.

En el aislado Mx-Black 870 (fig. 4) se observó que de manera similar al Mx-Black 719, Silikare®, Biozid agrox® y Trylogy® no inhibieron el crecimiento del patógeno, mientras que sí lo hicieron 383 y A5030, con valores de 72.7 y 74.87%, respectivamente. Progranic Mega®, Actinovate®, Javelin® y Serenade® también mostraron resultados favorables en cuanto a la inhibición del patógeno, siendo el mejor controlador de crecimiento micelial del patógeno Sanosil® (100%).

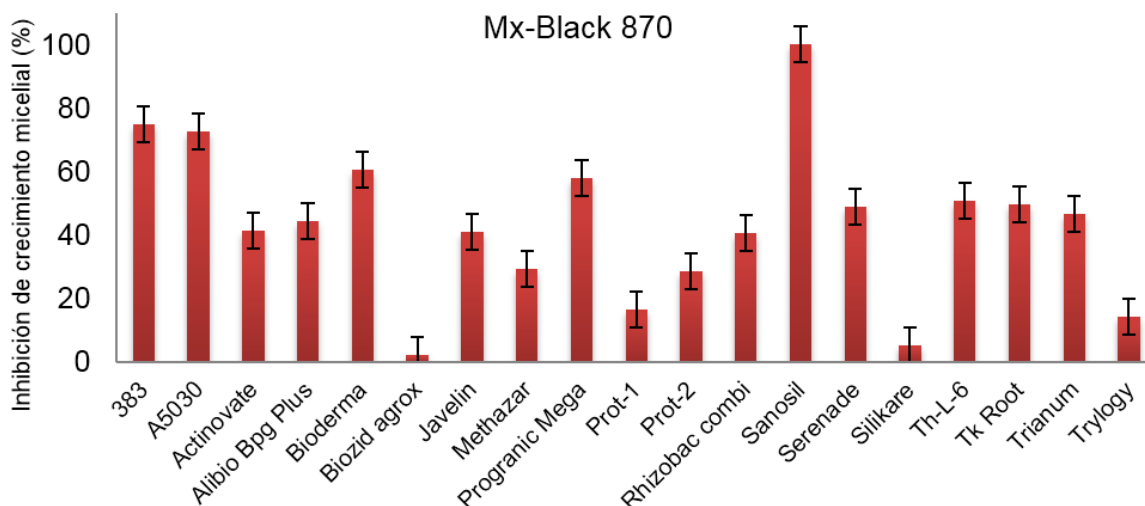


Figura 4. Efectividad de diferentes biofungicidas y productos biorracionales como inhibidores del crecimiento micelial *in vitro* del aislado de *F. oxysporum* Mx-Black 870, procedente de zarzamora.

Para el aislado Mx-Black 872 (fig. 5), Sanosil® mostró el mejor porcentaje de inhibición (100%). Al igual que los aislados anteriores los productos A5030, 383 y Progranic Mega® mostraron resultados satisfactorios, inhibiendo crecimientos diametrales en porcentajes de 70.3, 71.8 y 69.8%, respectivamente. Para este aislado se observaron resultados moderadamente positivos de los productos Javelin®, TkRoot® y Albio Bpg Plus®.

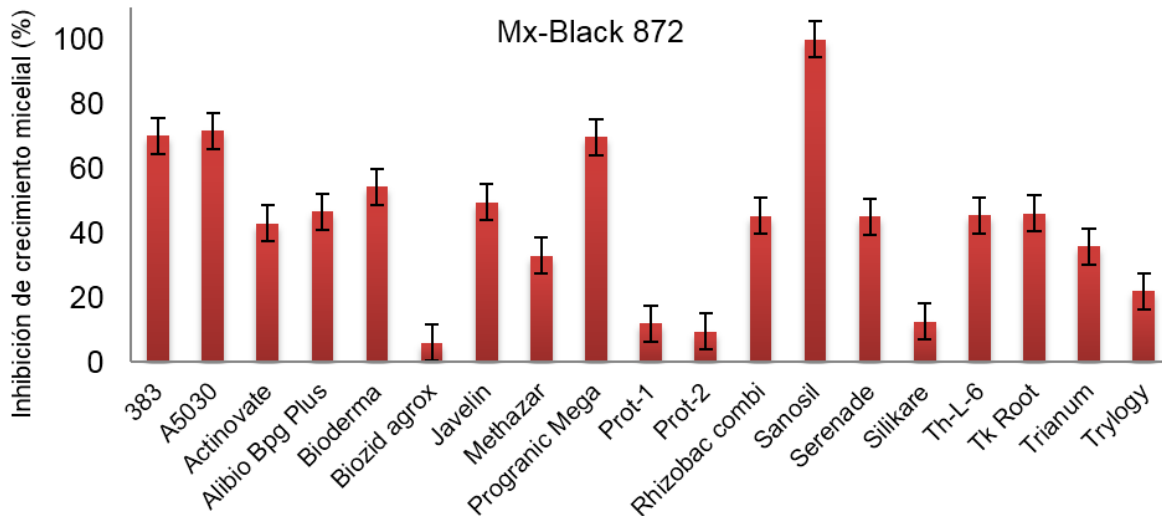


Figura 5. Efectividad de diferentes biofungicidas y productos biorracionales como inhibidores del crecimiento micelial *in vitro* del aislado de *F. oxysporum* Mx-Black 872, procedente de zarzamora.

Para el aislado Mx-Straw 852, procedente de fresa (fig. 6) se observó crecimiento de *F. oxysporum* para los productos Silikare®, Biozid agrox®, Prot-1 y Prot-2, en cuanto a los productos que mejor resultados ofrecieron se encuentran Sanosil® (100%), A5030 (70.76%), 383 (72%) y Progranic Mega® (69.39%). En este caso Th-L6, Rhizobac combi® y TkRoot®, mostraron resultados moderados respecto a la inhibición del crecimiento del patógeno.

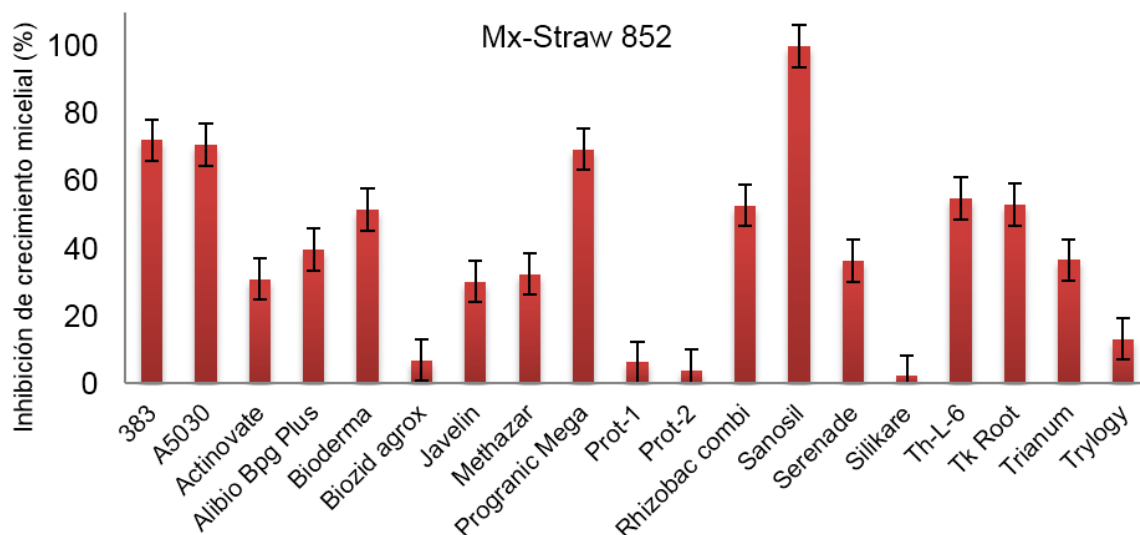


Figura 6. Efectividad de diferentes biofungicidas y productos biorracionales como inhibidores del crecimiento micelial *in vitro* del aislado de *F. oxysporum* Mx-Straw852, procedente de zarzamora.

CONCLUSIONES

- Sanosil® (Peróxido de hidrógeno + plata) inhibió el 100% del crecimiento micelial de *F. oxysporum* en los 4 aislados.
- 383 y A5030 (cepas de *Streptomyces* spp.) inhibieron alrededor de 72%, creciendo a una velocidad superior a la del patógeno en los cuatro aislados.

- Th-L6® (*T. harzianum*), Rhizobac combi® (*B.cereus*), Bioderma® (*T. harzianum*), Tk Root® (*T. harzianum*) y Progranic Mega® (Extracto de Gobernadora), mostraron resultados moderados con porcentajes de inhibición entre 50% y 63% en los cuatro aislados.
- El resto de los productos no ejercieron control eficaz sobre el crecimiento del patógeno.
- Se observó una gran consistencia en cuanto al efecto de los diferentes productos sobre todos los aislados, pudiendo sugerir que el efecto de los productos sea similar en las diferentes zonas de producción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rey, M., Delgado, J. J., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Benítez, T., 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev. Iberoam Micol* 17: S31-S36.
2. Monte, E., 2001. Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbio* 4: S1-S4.
3. Ramírez-Legarreta, M.R y Jacobo-Cuellar, J.L., 2002. Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: S168-S173.
4. Anderson, B.S., J.W. Hunt, B.M. Phillips, P.A. Nicely, V. Vlaming, V. Connor, N. Richard y R.S. Tjeerdema, 2003. Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA). *Environmental Pollution* 124: S525-S532.
5. Bajwa, R., A. Kjalidy y T.S. Cheema 2003. Antifungal activity of allelopathic plant extracts. III. Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus*. *Pakistan Journal of Plant Pathology* 2: S145-S156.
6. SIAP, 2018. Atlas Agroalimentario 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Tomado de la base de datos http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017
7. Quintero, E., URDANETA, L. 1997. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de hongos *Macrophomasp.*, agente causal de la pudrición apical del fruto del Guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Facultad de Agronomía*. 14 S233-S244
8. Díaz, A. 1986. Eficacia a nivel preventivo y curativo de diversos fungicidas contra el hongo *Heterosporium echinulatum* *in vitro*. Trabajo de grado para optar por el título de Bacteriólogo. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de las ciencias Básicas. Bogotá. S50.
9. Achicanoy, H. 1981. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Crinipellis pernicioso* Stehel Singer *Monilophthororeri* (cif y Par). Tesis Magister. Facultad de ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia – ICA. S51.
10. Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: S4-S10.
11. Agrios, G. N. 2005. *Plant pathology*, quinta edición, Academic Press Nueva York 803 p.
12. Ochoa J., Fonseca G. 2000. First Report of Fusarium Wilt of Babaco (*Carica x heilbornii* var. pentagona) in Ecuador. *Revista Plant Disease*. 84: S190.
13. Quillay N. 2011. Determinación de la capacidad embriogénica de babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) a partir de óvulos y hojas multiplicadas *in vitro* vía embriogénesis somática. Tesis de Magister en Gestión de la Producción de Flores y Frutas Andinas para Exportación. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. 114 p.

ELABORACION DE TORTILLAS DE MAIZ Y BAGAZO DE ZANAHORIA

Maria Gloria Cornelio Moreno, Rosa Maria Garcia Martinez

Facultad de QuímicoFarmacobiología, UMSNH. Morelia, Michoacán

RESUMEN

La tortilla de maíz es el símbolo más antiguo de la cultura culinaria de nuestro país. Sin importar la clase social a que se pertenezca, la tortilla se consume a diario por el 94% de los mexicanos, acompañando los platillos típicos de nuestra gastronomía. En México, en 1998 el consumo per cápita anual de tortilla era de 94.8 kilos, para 2009 fue de 80 kilos, según la encuesta bianual de consumo de tortilla que elabora Gruma. Dentro de los factores que han contribuido a esta situación se encuentran el alto precio internacional del maíz y la presencia de sequía en áreas donde se cultiva este grano.

INTRODUCCIÓN

La zanahoria pertenece a la familia *Umbelliferae*, especie *Daucus carota*. Las formas cultivadas derivan de *Daucus carota*, variedad *sativa*. Zanahoria es el nombre común de una planta originaria de Eurasia y el norte de África y ampliamente distribuida por todas las regiones templadas del hemisferio norte; el nombre se aplica también a la raíz de la planta. La zanahoria es la raíz pivotante engrosada de la planta —de color anaranjado, aunque también hay variedades de color amoratado o amarillo—, que acumulan los nutrientes necesarios para mantener la parte aérea, de hasta 1,5 m de altura, que se forma si se deja en el suelo durante el segundo año de crecimiento. El tallo lleva una umbela de flores blancas o rosadas parecida a un nido.

La variedad silvestre forma una raíz dura y leñosa no apta para el consumo pero la cultivada es, por el contrario, una hortaliza muy apreciada. En España, la variedad cultivada más común es la semilarga de Nantes.

El término de fibra alimentaria se define como los residuos de las células vegetales que resisten a la hidrólisis enzimática del intestino delgado, fue creado inicialmente en el contexto médico por su beneficio a la salud. Las fibras de las hortalizas se consumen en forma fresca o transformada o bien se extraen de las hortalizas en una forma más o menos purificada para dar lugar a una gama de ingredientes para la formulación de productos alimentarios

Su incorporación en los alimentos industrializados responde a la vez a las recomendaciones de los especialistas en nutrición para aumentar el aporte cotidiano de fibra y representa una oportunidad para los productores de cereales y hortalizas así como para la industria procesadora para utilizar diversos subproductos. La ventaja de los alimentos ricos en fibra es que producen saciedad y reducen con ello la tentación de comer entre comidas. La falta de fibra en la dieta produce estreñimiento y puede causar diversos trastornos en el sistema digestivo cáncer del colon.

TEORÍA

La zanahoria contiene una cantidad apreciable de hidratos de carbono y un alto contenido en fibra, tanto soluble como insoluble. Si bien el aspecto más destacable de este alimento desde el punto de vista nutricional es su contenido en vitamina A (una zanahoria de tamaño medio cubre el 89% de las necesidades diarias de esta vitamina para hombres de 20 a 39 años y el 112% para mujeres de la misma edad), y en concreto en carotenoides con actividad provitamínica A (que una vez en el organismo se transforman en vitamina A, vitamina necesaria para el buen funcionamiento de la retina y especialmente para la visión nocturna o con poca luz y para el buen estado de la piel y mucosas). El más abundante es el b-caroteno (6.628 µg/100 g de porción comestible), al que algunos estudios han atribuido un papel preventivo frente a enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular senil, dada su capacidad antioxidante y moduladora de la respuesta inmunitaria. Le sigue el a-caroteno, cuyos niveles séricos se han relacionado inversamente con la presencia de enfermedad coronaria y formación de placa arterial; y cantidades traza de criptoxantina. En la zanahoria, existen además, otros carotenoides sin esta actividad, como la luteína (288 µg/100 g de porción comestible). Ésta se localiza en retina y cristalino de ojo, pudiendo prevenir el daño oxidativo inducido por la luz y protegiendo, por tanto, frente al deterioro asociado a la edad (cataratas y degeneración macular senil). Otras vitaminas presentes en

cantidades más discretas son la vitamina C y la vitamina B6. También contienen pequeñas cantidades de minerales como hierro, yodo y potasio.

PARTE EXPERIMENTAL

Para la preparación de las tortillas se utilizó como materia prima masa adquirida de una tortillería del la ciudad de Morelia y el bagazo de zanahoria de un local comercial de jugos de la misma ciudad para la elaboración de la tortillas se integro 250gr de bagazo por 1kg de masa para su cocimientos se realizo por el método tradicional para el análisis proximal se determino de acuerdo a la metodología de la AOAC.

Determinación de humedad

Se determinó por el método 934.01 de la AOAC (1990). Norma técnica de referencia NMX-F083-S-1986.

La humedad de la muestra se determinó mediante el porcentaje de agua eliminada por evaporación durante un calentamiento en una estufa a 105 °C por 3 h.

Determinación de cenizas

Se determino por incineración por el método 962.02 de la AOAC (1990). Norma técnica de referencia NMX-F-607-NORMEX-2002

El contenido de cenizas presentes en la muestra se determinó por medio de una incineración, previo calentamiento en una parrilla eléctrica para su final calcinación, en una mufla a 560 °C por 3 h.

Determinación de lípidos

Se determino por el método 920.85 de la AOAC (1997) y NMX-F-615-NORMEX-2004.

Determinación de proteína

Se basó en la determinación de nitrógeno orgánico de la muestra, realizándose en dos partes, la primera consistió en la descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento, en presencia de ácido sulfúrico concentrado, y luego se registró la cantidad de amoníaco obtenido de la muestra por titulación con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N, en presencia de rojo de metilo.

RESULTADOS

Análisis fisicoquímico de la tortilla de bagazo de zanahoria y maíz.

Los resultados

Determinaciones	Tortilla normal	Tortilla con bagazo
Humedad	45.9566	50.4505
Ceniza	0.78603	1.01723
Lípidos	0.780967	0.691433
Fibra	0.142400	0.285067

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultado podemos concluir que la utilización de bagazo como sustituto o como ingrediente adicional a los alimentos puede generar un beneficio a la salud por su propiedades como los es la fibra ya que muchas enfermedades que la población padece es a causa del bajo consumo de ciertos nutrientes como son los alimentos ricos en fibra otra de las causas que provoca graves enfermedades es el no consumir frutas y verduras. la elaboración de alimento enriquecidos se les da una mejor aceptación por los consumidores en este caso la tortilla es aceptada por el público por lo cual este es un gran proyecto de investigación para dar presentaciones diferente a lo que es la masa de maíz el bagazo se presta para ser adicionado a diferentes alimentos como pueden ser galletas, panque, totopos, gelatina que son algunos de los alimentos que estamos estudiando.

BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC (1997). Official Methods of Analysis. Official Anal. Chem. 20 ed. Washington, D.C.
2. Artchey.D 1992. Procesado de hortalizas. España. Ed. Acribia S.A. Pág. 134,182 – 188.

-
3. Belitz H.D. 1997. Química de los Alimentos. Segunda edición. España. Ed. Acribia,S.A.Pág.351
 4. Bergelet. G. 1953. Conservas Vegetales: Frutas y Hortalizas.Primer edición. Barcelona. Pág 464 – 467

EL EFECTO DEL FOTOPERIODO EN LA REPRODUCCIÓN EN YEGUAS

Lucio Domínguez, R.¹; Sesento García L.²; Bedolla Cedeño J. L. C.¹; Cruz Hernández A. R.¹; Marcos Antonio R.¹; Chávez Chávez M.¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ² Colegio Primitivo y Nacional de San Nicolás de Hidalgo.
E-mail: dr.rlucio@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de esta investigación es conocer el efecto del fotoperiodo en yeguas y ver como influye en la reproducción. La actividad reproductiva en la yegua es estacional. La estación reproductiva natural de las yeguas se extiende desde la prima-vera hasta finales del verano, lo que en el hemisferio norte implica desde abril hasta septiembre, y en el hemisferio austral desde octubre hasta marzo. Los caballos son llamados reproductores “de días largos”, ya que su actividad cíclica normal se activa, principalmente, por el aumento en la duración del día (es decir, el fotoperiodo creciente) a principios de primavera, mientras que a finales de verano y principios del otoño, el acortamiento de la duración del día (es decir, el fotoperiodo decreciente) desencadena la finalización de la estación reproductiva. En primavera, factores secundarios, como el aumento de la temperatura y la mejora de la ingesta dietética, aceleran el inicio de la actividad reproductiva. Hay una fuerte relación entre el fotoperiodo y la aparición de la ovulación. La ovulación en la hembra es mínima o está ausente durante el invierno y tiene su máxima frecuencia en verano. La primavera y el otoño se consideran periodos de transición y se caracterizan por ciclos estrales frecuentes e irregulares que varían tanto por lo que respecta a la duración del ciclo como al momento de la ovulación. La folículoogénesis es un proceso bastante conservado entre los mamíferos existen características diferentes según las especies. Las bases endocrinológicas de la dinámica ovárica son similares con algunos cambios según las especies. Una excepción la constituye la hormona melatonina. Esta última inhibe o estimula la liberación de GnRH según se trate de una especie fotoperiódica positiva o negativa. Palabras clave: Fotoperiodo, Reproducción, Ovulación.

INTRODUCCIÓN

La yegua es poliestrica estacional. La actividad reproductiva es primariamente regulada por el fotoperiodo, pero también por la nutrición y el clima (principalmente la temperatura). Alrededor del mundo la mayoría de las yeguas sufren la actividad del ciclo sexual durante la primavera y el verano (estación de cría), y solamente algunas yeguas son reproductivamente activas durante el invierno (estación de anestro). (De la Cera. 2003)

El ciclo estral se define como, el período de tiempo que va desde el inicio del celo o estro hasta el inicio del siguiente. En este ritmo biológico se pueden diferenciar las siguientes fases: Estro, fase de receptividad sexual, durante la cual se produce la ovulación. Metaestro, período inicial de formación del cuerpo lúteo. Diestro, fase de predominio de la actividad del cuerpo amarillo o lúteo, también se le denomina progestacional. Proestro, período previo al estro. (Ramírez. 2006)

Se divide en dos etapas, una es la fase folicular (estro) y la otra es la fase lútea o diestro, durando entre 4 a 7 días y entre 14 a 15 días respectivamente, dando un total de 21 días en promedio de duración del ciclo. Esto se cumple en los meses estivales, no tan así en los meses de primavera y otoño donde se encuentran los celos de transición que son más largos dando un estro de 7 a 10 días y un diestro de 14 días (Quattrocchio. 2016).

DESARROLLO

Fotoperiodo

Las yeguas durante el año van sufriendo ciertas modificaciones en la actividad de sus ovarios, esta actividad va en concordancia con las horas luz que hay durante el día en las diferentes estaciones. (Broto, 2014).

El ciclo estral está regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios, el cual mediante mecanismos neuroendocrinos, produce variaciones en la funcionalidad ovárica. La luz es la desencadenante de este mecanismo, la retina del globo ocular detecta este estímulo lumínico y lo convierte en un impulso nervioso el cual se transmite vía nervio óptico, pasando por el ganglio cervical superior y por fibras

postganglionares hasta alcanzar la glándula pineal, ubicada entre los dos hemisferios cerebrales, transformando ese estímulo nervioso en una descarga hormonal. Esta glándula es considerada el mediador entre los receptores de luz y el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (Quattrocchio. 2016)

La actividad ovárica aumenta conforme se incrementan las horas luz, hasta alcanzar, en el hemisferio Norte, un patrón cíclico regular entre abril y septiembre (temporada reproductiva o época ovulatoria), que corresponden con el periodo de mayor longitud del día. Posteriormente, la actividad ovárica se reduce conforme disminuye la duración de la luz diaria, hasta llegar a cesar durante noviembre a enero (temporada anovulatoria), cuando los días son más cortos. En el hemisferio Sur las temporadas reproductiva y de anestro se invierten debido a que la longitud del día también sigue un patrón opuesto al del hemisferio Norte (López 2010).

Las yeguas en los días con mayor cantidad de horas luz como el verano de cada año, las hembras presentan ciclos estrales y, por consiguiente, pueden concebir. En la temporada en que se reduce el fotoperíodo (invierno) ocurre lo contrario, permanecen en un período anovulatorio no cíclico: anestro. Con base en su actividad ovárica y debido a que la duración de la gestación es de alrededor de 11 meses, la yegua generalmente presenta sus partos en la primavera, como las demás especies con reproducción estacional. Esta actividad reproductiva se debe a que en la primavera encuentran las condiciones apropiadas para la supervivencia de su descendencia. Sin embargo, no en todas las explotaciones de equinos coincide la fisiología reproductiva de estos animales con el interés de los productores. (Vázquez. 2004).

Dinámica ovárica durante el ciclo reproductivo

La yegua es poliéstrica estacional con fotoperíodo positivo. Es decir presenta varios ciclos estrales durante la temporada reproductiva, y se encuentra regulada por la cantidad de horas luz. El año calendario puede dividirse en cuatro etapas que difieren endócrina y fisiológicamente: etapa anovulatoria, transición de primavera, etapa reproductiva y transición de otoño (Gigli. 2006)

Etapas anovulatoria: La liberación de melatonina es bloqueada por el estímulo producido por la luz. Durante el invierno, la mayor cantidad de horas de oscuridad, producen una cantidad suficiente de melatonina como para bloquear el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal. Como consecuencia, la GnRH es liberada en forma pulsátil con muy baja amplitud y frecuencia (pulsos débiles con intervalos muy largos entre cada liberación), resultando insuficiente para producir secreción de FSH y LH. A la palpación rectal, los ovarios se palpan chicos y duros por la ausencia de folículos antrales grandes (> 15 mm). La activación inicial de folículos preantrales, como se explicó anteriormente puede continuar ya que este es un proceso gonadotrófico independiente. Se prefiere denominar a esta etapa anovulatoria y no anestro ya que algunas yeguas presentan signos de celo debido a la ausencia de progesterona y la liberación de estradiol desde las glándulas adrenales. La FSH durante el invierno se libera con una frecuencia de un pulso cada dos días siendo insuficiente como para producir el crecimiento de folículos mayores a 15 mm. (Alexander 1991).

Transición de primavera: El inicio de la actividad reproductiva se produce paulatinamente y luego de pasar por un período de aproximadamente 2 meses de transición. Durante este período, la concentración de FSH es óptima para producir el reclutamiento de folículos pero al no liberarse LH en cantidad suficiente, no se desencadena la ovulación. La deficiencia estacional que se observa en la liberación de LH resulta en una concentración baja de los factores presentes en el líquido folicular como IGF-I, estradiol, inhibinas y factores angiogénicos (VEGF). Todo esto conduce a que no se produzca la ovulación. La concentración baja de estradiol e inhibinas a su vez, lleva a una mayor concentración de FSH porque no se produce el mecanismo de retroalimentación negativo. Al principio de la transición ocurren sólo ondas foliculares menores. Se denomina ondas foliculares menores al reclutamiento de un número determinado de folículos que crecen entre 6 y regresan simultáneamente sin la formación de un folículo dominante. Al final de la transición, ocurren ondas foliculares mayores. Se produce el reclutamiento de un conjunto de folículos antrales que si bien regresan todos, uno de ellos logra alcanzar mayor tamaño que los demás, más de 21 mm de diámetro. A la palpación los ovarios se palpan como «racimos de uvas» por la presencia de muchos folículos de tamaño similar entre ellos (20-30 mm). El comportamiento de la yegua en esta etapa se caracteriza por tener celos largos e irregulares. La elevación de la LH permite la primera ovulación dando por terminado la etapa de transición y el comienzo de la etapa reproductiva (Ginther 2004).

Etapas reproductiva: El comienzo de la etapa reproductiva sucede cuando las horas luz son suficientes para suprimir el reflejo inhibitorio producido por la melatonina sobre la liberación de

GnRH. Los primeros ciclos del año suelen ser irregulares, adquiriendo más regularidad en cuanto a duración, a medida que avanza la estación reproductiva. La liberación de GnRH es continua con pulsos adicionales cada dos horas en diestro y dos pulsos cada hora en estro. En la yegua puede ocurrir una o dos ondas foliculares mayores por ciclo estral ya que la concentración de FSH puede ser secretada siguiendo un patrón uni o bimodal. Cuando es secretada con un patrón bimodal presenta un aumento plasmático del día 3 al 5 y un segundo aumento entre los días 11 a 13 del ciclo. Más entrada la etapa reproductiva, la FSH puede tener un patrón de secreción unimodal, aumentando solamente una vez por ciclo. A diferencia de la transición, en la temporada reproductiva sólo ocurren ondas foliculares mayores, ya que siempre se produce un folículo dominante. Según el momento del ciclo en que se producen las ondas foliculares, se subclasifican en onda mayor primaria y onda mayor secundaria. Se define como onda mayor primaria al grupo de folículos que darán origen a la ovulación estral. La ovulación ocurre 24-48 horas antes de que finalice el estro. La onda mayor secundaria es la activación y diferenciación de folículos terciarios cuyo folículo dominante adquiere su mayor tamaño durante el diestro. Comienza a observarse ecográficamente al final del estro del ciclo anterior. La onda mayor secundaria varía su incidencia según la raza y en general se observa con mayor frecuencia al comienzo de la etapa reproductiva anual, ya que como se explicó, la FSH no siempre tiene una modalidad de secreción bimodal. La yegua es una de las especies domésticas que puede ovular con concentraciones altas de progesterona. Por lo tanto, a diferencia de otras especies, el folículo dominante de la onda mayor secundaria puede llegar a ovular (ovulación diestral). Si esta ovulación ocurre alrededor del día 10 del ciclo, al producirse la liberación del endometrio de PGF2alfa, se producirá la lisis del CL diestral al mismo tiempo que el CL primario. En cambio, si la ovulación diestral ocurre más tardíamente no podrá responder a la liberación de PGF2alfa y persistirá alargando la duración normal del diestro, formando un cuerpo lúteo persistente. (Ginther 1992).

Transición de otoño: Aunque los cambios fisiológicos que ocurren en la transición de otoño no están tan definidos como en el resto de las etapas anuales, se puede afirmar que durante el otoño ocurren cambios paulatinos que van a terminar temporalmente con la activación de folículos antrales y el mecanismo de la ovulación. Irvine et al (2000) observaron que la FSH vuelve a tener un patrón bimodal de secreción como al inicio de la temporada reproductiva con un pulso cada dos días. La concentración sérica de la LH disminuye más rápidamente luego de su aumento pre-ovulatorio y finalmente no logra alcanzar los niveles necesarios para desencadenar la ovulación. (Gigli. 2006).

Luz artificial

Es sabido, desde los primeros tiempos, que el aumento de las horas luz por medios artificiales produce la transición del anestro a la etapa de ciclos fértiles regulares. Los equinos como la mayoría de los animales poseen lo que se denomina "reloj biológico". La exposición a 14 - 16 horas de luz pone en 5 marcha el reloj biológico para la actividad de días largos o de tiempo estival. En algunos criaderos prefieren los partos al principio del año, lo que se puede lograr aplicándoles tratamientos de luz artificial, adicional a la del fotoperiodo natural, en la temporada de días con menor luminosidad. (Adams, 1993)

Con este tratamiento se adelanta la temporada de concepciones y, como consecuencia, las yeguas pueden parir en los primeros meses del año (Vázquez. 2004).

Las yeguas se colocan en corrales iluminados por la tarde controlando el encendido de las luces por medio de células fotoeléctricas. Luego de 2,5 horas (o las que fuesen necesarias para completar las 16) las luces se apagan y las yeguas deben volver a sus potreros. Si este método es puesto en práctica en Enero, algunas yeguas comenzaran a ciclar al principio de la temporada reproductiva. Con respecto a la luz, cualquier forma es efectiva, ya sea fluorescente o incandescente de 100 o 200 watt. (De la Cera. 2003).

Durante el período de anestro, la mayoría de las yeguas no muestran receptividad sexual y no desarrollan folículos que ovulen. En el hemisferio norte, el período de anestro de la yegua ocurre frecuentemente durante la mayoría del invierno (mediados de noviembre a mediados de febrero). Hay excepciones en esto ya que algunas yeguas muestran señales de receptividad sexual a lo largo del año, aunque normalmente no ovulan durante el invierno (Montenegro 2006).

CONCLUSIÓN

El fotoperiodo afecta drásticamente la reproducción de las yeguas así como la tasa de ovulación y producción de hormonas.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H. 1991. Control of onset of breeding season in the mare and its artificial regulation by progesterone treatment. *J Reprod Fertil Suppl.*; 44:307-318.
2. De la Cera P.E. (2003). CICLO ESTRAL DE LA YEGUA. 2003, de equisan Sitio web: <http://www.equisan.com/images/pdf/ovulacion.pdf>
3. DOMESTICOS, A. (2006). El ciclo estral y menstrual. *Mundo Pecuario*, 2(2), 30-31.
4. Gigli, I., Russo, A., & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *In Vet*, 8(1), 183-204.
5. GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. 2004. Follicle dynamics and selection in mares. *Anim Reprod* 1:45-63.
6. GINTHER, O.J. (Ed.) Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. Cross Plains Wisconsin, Equiservices Publishing, 1992.
7. López Pérez, L. M., Zarco Quintero, L., & Boeta Acosta, A. M. (2010). Inducción de la actividad ovárica en yeguas criollas con un programa de fotoperiodo artificial en la latitud 19° 9'N. *Veterinaria México*, 41(2), 89-100.
8. Montenegro, J. A. R. (2006) determinación del fotoperiodo sobre la actividad ovárica en yeguas durante el año, en diferentes horas, en los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez y Escuintla.
9. Quattrocchio T.M. et al. (2016). Anestro postparto en yeguas sangre pura de carrera. 2016, de Facultad de ciencias veterinarias -UNCPBA Sitio web: <http://ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/743/QUATTROCCHIO,%20TOMAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
10. VÁZQUEZ-DUEÑAS, S., ESCOBAR-MEDINA, F. J., COLINA-FLORES, F., & HAYEN-VALLES, S. (2004). Comportamiento reproductivo de yeguas Pura Sangre Inglés en un criadero de partos al principio del año. *Rev Biomed*, 15, 27-31.
11. Adams G.P. et al. (1993) clínica veterinaria de norte américa práctica equina 1993. Intermedica. http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/FisiopatologiadelaReproduccion/images/Documentos/2016/4-Clinica_veterinaria_de_Usa-Practica_Equina_1.pdf
12. Broto T.M.. (2014). CICLO ESTRAL DE LA YEGUA.: 2014, de equisan Sitio web: <http://www.equisan.com/images/pdf/sincro.pdf>

EFFECTO DEL ESTADO DE MADURACIÓN DEL FRUTO, EL PESO DE LA SEMILLA Y EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN LA GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE CANDELILLA (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.)

Jorge Alberto Villarreal Garza*, Brenda Soto García, Marco A. Alvarado Vázquez, Rahim Foroughbakhch

*Universidad autónoma de Nuevo León, Depto. de Botánica, email: Jorge.villarrealga@uanl.edu.mx

RESUMEN

Euphorbia antisiphilitica Zuc. es un recurso forestal muy importante en las zonas áridas del norte del país, debido a su explotación intensiva, grandes áreas se han visto degradadas, y con ello una gran disminución en las poblaciones, por lo que es necesario plantear estrategias para su conservación y aprovechamiento sustentable. De ahí que una de las necesidades prioritarias para su regeneración es conocer su proceso reproductivo y en particular los factores bióticos y/o abióticos que determinan la viabilidad y germinación de sus semillas. Por lo anterior, y con el objetivo de contribuir al conocimiento de la biología de las semillas de candelilla se realizó el presente estudio donde se evaluó la morfología de la semilla, germinación y viabilidad en relación al estado de maduración del fruto, el peso de la semilla y el tiempo de almacenamiento. Para esto, se realizaron 3 ensayos de germinación correspondientes a los meses de almacenamiento 1, 3 y 5; en cada uno de los meses se determinó la viabilidad mediante la prueba de tetrazolio. Los resultados morfo- métricos de la semilla presentaron un promedio de 2.58 ± 0.35 mm de longitud, 1.79 ± 3.28 mm de ancho y un grosor de 1.58 ± 1.25 mm, la predominancia de la coloración fue café, la forma piriforme y superficie faveolada, el peso promedio de una semilla fue de 0.0029 ± 0.0010 gr. Las semillas con el mayor peso fueron las que obtuvieron el mayor porcentaje de viabilidad entre 56-74% (frutos rojos), sin embargo, las semillas provenientes de frutos verdes fueron las que obtuvieron la mayor viabilidad en el mes quinto.

INTRODUCCION

La candelilla es una especie vegetal que crece en las condiciones más desfavorables de las zonas áridas de nuestro país, su importancia económica radica que, como medida de defensa, la planta secreta cera que cubre sus tallos y la protege del frío y la sequía extrema. Dicha cera es extraída por los campesinos, conocidos como "candelilleros", para su comercialización, representando esta actividad el soporte económico de muchas familias del norte de México.

México es prácticamente el único país que produce cera de candelilla en el mundo (a excepción de la región del Big Bend en Texas, cuya producción y calidad es pobre), la cual exporta a diferentes países desde principios del siglo XIX, el aprovechamiento y explotación de la candelilla en México se centra en los estados de Coahuila, Durango y Chihuahua.

Es importante mencionar que el método tradicional de explotación del recurso, origina la destrucción total de las plantas, lo que ha ocasionado que muchas poblaciones naturales de candelilla sean eliminadas, a pesar de su gran capacidad regenerativa (Cervantes, 1992).

Aunque la candelilla se reproduce naturalmente mediante semillas, el cultivo de la candelilla por semillas es muy difícil, debido al escaso número de semillas que produce la planta; la recolección de las semillas es muy difícil ya que son lanzadas a gran distancia al abrirse el fruto y el tiempo que tarda en desarrollarse. Aun así, a largo plazo sería conveniente probar esta forma de reproducción, ya que permitiría una propagación muy abundante (Esquivel, 1979).

Con la finalidad de evaluar el efecto del estado de la maduración del fruto, el peso de la semilla y el tiempo de almacenamiento de las mismas sobre la germinación y viabilidad de la semilla, se realizó el presente trabajo donde se pretende contribuir al conocimiento de la semilla de candelilla, a fin de aportar datos acerca de su estructura y el funcionamiento en las diferentes localidades de la zona candelillera y poder así utilizar estas técnicas a futuro en el mejoramiento y manejo de poblaciones de candelilla en las zonas devastadas.

TEORICO

La familia Euphorbiaceae es una familia cosmopolita, de hábitats diversos, comprende alrededor de 280 géneros y más de 8000 especies. Son árboles, arbustos, subarbustos, hierbas o plantas

suculentas cactiformes con o sin espinas, a veces también son plantas anuales, con jugo lechosos o sin él; de hojas alternas o raramente opuestas, simples o compuestas, a veces reducidas o faltan, de estipulas presentes; con flores unisexuales, plantas fundamentalmente monoicas, sépalos valvados, imbricados o en inflorescencias muy especializadas, a veces reducidas; faltan los pétalos, a veces presentes, otras veces unidos; anteras de 2, 3, o 4 cerdillas, rectas o recurvas en el botón, dehiscencia longitudinal, raramente poricida; ovario rudimentario a veces presente en las flores casi siempre trilobular, estilos libres o unidos a la base; óvulos solitarios en pares, péndulos, funículo a veces engrosado, disco a menudo presente en las flores de ambos sexos, anular o de glándulas separadas; el fruto es una capsula o drupa; semillas a menudo con la carúncula conspicua, endospermo abundante, carnoso, embrión recto.

En el género *Euphorbia* destaca el ciato como estructura distintiva de organización de los órganos florales (Cano y Marroquín, 1994).

Una semilla es un óvulo fertilizado y maduro que tiene la capacidad de ser transportado en el medio ambiente y en condiciones favorables dar origen a un nuevo vegetal (Camacho, 1994), son la forma en como las plantas dan origen a nuevas plantas y junto con el polen son la única forma móvil de las especies vegetales (Jurado, 2004).

Las semillas y los frutos de las diferentes especies varían en aspecto, tamaño, forma, ubicación y estructura del embrión, con relación a los tejidos de almacenamiento. Estos caracteres no solo son útiles en la identificación sino también en los requerimientos de germinación.

La semilla está compuesta de tres partes básicas que son el embrión, los tejidos de almacenamiento y las cubiertas de la semilla. El embrión es una nueva planta que resulta de la unión de los gametos masculino y femenino durante la fecundación. Su estructura básica en un eje embrionario, con un punto de crecimiento en cada extremo, uno para el tallo y otro para la raíz, y una o más hojas seminales (cotiledones) adheridas al eje embrionario. Las semillas no endospermicas almacenan alimento en los cotiledones, los cuales forman las partes dominantes de las semillas.

Las cubiertas de la semilla proporcionan protección mecánica al embrión. Las cubiertas de las semillas pueden desempeñar un papel importante al influir sobre la germinación de las mismas (Hartmann y Kester, 1999).

La germinación es la reanudación de las actividades de crecimiento del embrión, suspendidas o disminuidas al momento de alcanzar la semilla su madurez fisiológica. (Peretti, 1994), la cual es fundamental para determinar la distribución y abundancia de cualquier especie vegetal y puede ayudar a entender y predecir su dinámica poblacional (Jurado, 2000).

La germinación es el proceso mediante el cual el embrión de la semilla adquiere el metabolismo necesario para la reiniciación del crecimiento y transcribir las porciones del programa genético que lo convertirán en una planta adulta, y para que esto se realice son necesarias las siguientes condiciones:

- Viabilidad: cualidad de una semilla de estar viva, lo cual a pesar de ser una condición para la germinación, no implica que pueda realizarse.

- Quiescencia: implica que la semilla no haya germinado anteriormente, se define como el estado en que se encuentra una semilla que no germina debido a que el medio ambiente se lo impide, básicamente por falta de agua o por bajas temperaturas.

- Ambiente adecuado para el proceso: para que la germinación pueda realizarse, se requiere de suficiente humedad para que las semillas se embeban, de una composición gaseosa similar a la de las primeras capas de la biosfera y una temperatura entre 10 y 30° C que permita el crecimiento vegetal.

Ausencia de dormición: se requiere que no exista un mecanismo fisiológico que impida que la germinación en condiciones adecuadas para este proceso.

El proceso germinativo implica que, morfológicamente, el embrión de la semilla, se transforme en una plántula.

En las pruebas de laboratorio se considera la germinación, como la emergencia y desarrollo de las estructuras esenciales que provienen del embrión, y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta sana y establecerse en condiciones favorables (Camacho, 1994).

Hartmann y Kester (1999), mencionan que los factores ambientales que afectan la germinación de las semillas son agua, temperatura, aireación y luz.

Wilson y Loomis (1968) mencionan que varía mucho el tiempo que las semillas conservan su vitalidad y su potencia germinativa ya que semillas de algunas especies solo son viables durante algunos días o meses mientras que las de otras los son durante años. También menciona que la longevidad de la mayoría de las semillas aumenta si se las almacena en seco a baja temperatura al igual que Taylor (1997) ya que menciona que las variables extrínsecas que más afectan la calidad de la semilla almacenada son la temperatura y la humedad relativa.

EXPERIMENTO

Área de estudio

Las colectas se llevaron a cabo en localidades que corresponden al área candelillera del estado de Coahuila y el municipio de García, Nuevo León. Las localidades muestreadas fueron: Las Coloradas (Municipio de Ramos Arizpe, Coah.), Candela (Municipio de Candela, Coah.), Lomas de Icamole (Municipio de García, N. L.), Sierra de Australia (Municipio de Cuatro Ciénegas, Coah.), Las Morenas (Municipio de Cuatro Ciénegas, Coah.).

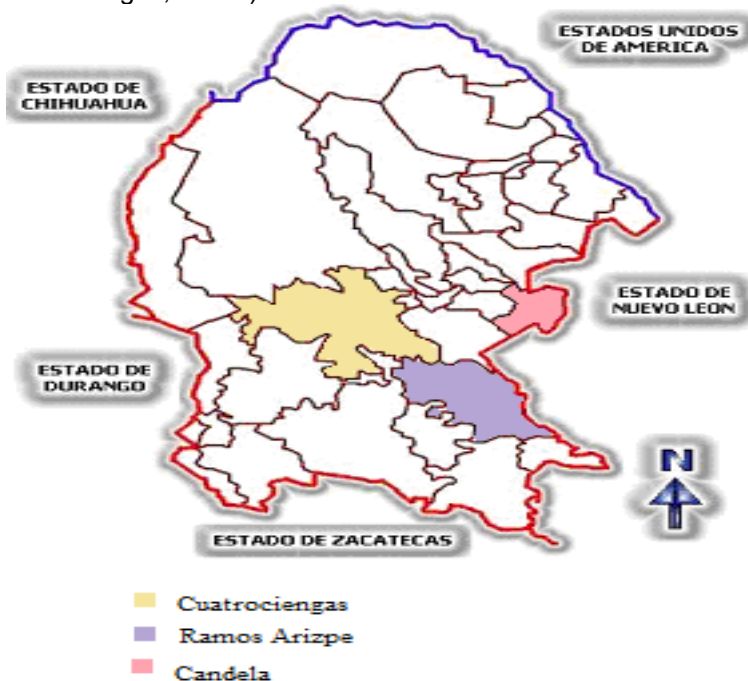


Figura 1. Mapa del estado de Coahuila, donde se muestra la localización de Cuatrociéngas, Ramos Arizpe y Candela.

Muestreo previo a la colecta, se llevó a cabo un monitoreo de la floración en los sitios de estudio mencionados anteriormente, con el fin de determinar el momento adecuado para la colecta de los frutos (cápsulas) y evitar la expulsión y pérdida de las semillas. Se colectaron frutos del mayor número de plantas posible para asegurar la variabilidad genética. La colecta se realizó de forma manual. Se utilizaron dos estrategias de colecta la primera para los sitios de Las Coloradas, Candela y Lomas de Icamole I y II, ya que en estas localidades la producción de frutos por planta fue escaso para evaluarlas de forma individual por lo que se optó por colectar la mayor cantidad de frutos posibles en la localidad, pero mezclando los frutos de todas las plantas.

Por otra parte, para las localidades de Sierra de Australia y Las Morenas donde la producción de frutos por planta fue abundante, se procedió a colectar los frutos separándolos por planta, utilizando para ello bolsas de papel debidamente etiquetados. Una vez colectados los frutos fueron llevados al laboratorio de Manejo Integral de Recursos Vegetales en el Departamento de Botánica de la FCB, UANL para su procesamiento.



Figura 1. Candelilla en floración



Figura 2. Candelilla en fructificación

Clasificación de semillas por peso

Para verificar la hipótesis de que el peso de la semilla afecta directamente su viabilidad y germinación y esperando que las semillas de peso más alto tendrían la mayor capacidad germinativa y viabilidad, los tres grupos de semillas resultado de la separación por coloración descrito anteriormente, para los sitios Las Coloradas Candela, Lomas de Icamole I y II fueron clasificadas ahora por su peso en tres categorías: a) Semillas de bajo peso, b) Semillas de peso promedio, c) Semillas de peso alto. Para el caso de las semillas provenientes de frutos verdes (de las localidades: Las Coloradas y Candela) los rangos se obtuvieron al sacar la desviación estándar de los datos obtenidos; esto se debió por el gran número de semillas obtenidas de estas coloraciones. Mientras que para las demás coloraciones (Verde-rojo y rojo) de las cuales no se obtuvieron demasiadas semillas el rango de peso se obtuvo mediante la fórmula $X \pm (0.43 \times S)$ donde: X = media S = Desviación estándar.

Tabla 2. Rangos de peso (en gramos) determinados para los sitios Las Coloradas, Candela, Lomas de Icamole 1 y 2.

Localidad		Verde	Rojo -Verde	Rojo
Las Coloradas	Peso bajo	<0.0010	<0.0014	*
	Peso medio	0.0011- 0.0026	0.0015- 0.0020	*
	Peso alto	>0.0027	>0.0021	*
Candela	Peso bajo	<0.0022	<0.0032	<0.0035
	Peso medio	0.0023- 0.0039	0.0033- 0.0042	0.0036- 0.0043
	Peso alto	>0.0038	>0.0043	>0.0044
Lomas Icamole 1	Peso bajo	<0.0025	<0.0027	<0.0028
	Peso medio	0.0026- 0.0033	0.0028- 0.0035	0.0029- 0.0036
	Peso alto	>0.0034	>0.0036	>0.0037
Lomas Icamole 2	Peso bajo	<0.0021	<0.0024	<0.0026
	Peso medio	0.0022- 0.0029	0.0024- 0.0029	0.0027- 0.0034
	Peso alto	>0.0030	>0.0030	>0.0035

* = No semillas

Una vez clasificadas las semillas, estas se almacenaron en recipientes herméticamente cerrados en un lugar fresco y seco para su posterior caracterización y utilización en las pruebas de viabilidad y germinación.

Para las semillas de Sierra de Australia y Las Morenas las cuales fueron separadas por planta, se seleccionaron las que contaban con más de 300 semillas. Se pesaron 100 semillas al azar de cada

planta y se obtuvieron los rangos también mediante a formula $x \pm (0.43 \times S)$. Las semillas de cada peso fueron puestas en bolsas plásticas y fueron etiquetadas y almacenadas.

Ensayo de germinación en función a la coloración, peso y tiempo de almacenamiento.

El ensayo de germinación se realizó con las semillas provenientes de Las Coloradas, Candela y Lomas de Icamole 1 y 2 tomando en consideración los siguientes criterios: a) Coloración del fruto (Semillas provenientes de frutos verdes, verde- rojizo y cafés), b) Peso de la semilla (Semillas de bajo peso, promedio y superior al promedio), c) Tiempo de almacenamiento (1, 3 y 5 meses).

Para todos los ensayos de germinación realizados, las semillas fueron sometidas a un tratamiento preliminar establecido particularmente para semillas de candelilla (Hernández, 2008) y que consiste en escarificación mecánica con papel lija durante 3 minutos. Posteriormente se desinfectaron las semillas con Hipoclorito de Sodio al 20% durante 5 minutos, y después se lavaron dos veces por 3 minutos con agua destilada. Finalmente se depositaron 20 semillas en cada una de las cajas petri con papel filtro estéril. El papel filtro se humedeció con agua destilada estéril y las cajas petri fueron llevadas a una cámara germinadora BIOTRONETT MARK-III, a una temperatura de 28°C con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Se llevó a cabo un monitoreo de la germinación durante 20 días y las variables que se tomaron en cuenta para el ensayo fueron: No. de semillas germinadas, % Germinación diario, % Germinación Total, mediante las ecuaciones:

$$GD = (\text{No. de semillas germinadas en el día}) / (\text{No. de semillas sembradas}) \times 100.$$

Germinación total

$$PG = (\text{No. de semillas germinadas en el periodo}) / (\text{No. de semillas sembradas}) \times 100$$

Análisis estadístico: Para el análisis de los resultados se utilizarán las pruebas de ANOVA factorial a fin de determinar diferencias estadísticas entre las localidades, el estado de maduración de los frutos y el peso de las semillas. Así mismo se utilizó una prueba de comparación múltiple de medias (Tukey) para comparar las medias de los diferentes niveles de las variables antes mencionadas. Finalmente se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para establecer la relación entre las variables de peso de la semilla, maduración del fruto y tiempo de almacenamiento con respecto a la germinación de la semilla. Estos análisis se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.0.

RESULTADOS

Peso de las semillas

El promedio general para el peso de una semilla en las localidades de Las Coloradas, Candela, Lomas de Icamole 1 y Lomas de Icamole 2 fue de 0.0029 ± 0.0010 g, siendo Lomas de Icamole 2 la localidad que presentó el peso mayor con 0.0036 ± 0.00010 g mientras que Las Coloradas presentó el menor peso con tan solo 0.0018 ± 0.0006 g (Figura 8). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas del peso entre las localidades ($p=0.00$). La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey mostró las diferencias colocando en grupos separados todas las localidades. Por otro lado la comparación del peso en relación a la coloración del fruto mostró que las semillas provenientes del fruto verde presentan el menor peso 0.0027 ± 0.0009 g, sin embargo las semillas provenientes de fruto verde-rojizo y rojos mostraron el mismo peso (0.0030 g).

Tabla 8. Valores promedio en g \pm desviación estándar y comparación múltiple de medias de Tukey correspondiente al peso de las semillas separadas por coloración.

Localidad	Verde	Verde- rojizo	Rojizo	Promedio general
Las Coloradas	0.0019 ± 0.0007	0.0018 ± 0.0006	0.0015 ± 0.0004	0.0018 ± 0.0006 A
Candela	0.003 ± 0.0009	0.0032 ± 0.0008	0.0033 ± 0.0009	0.0032 ± 0.009 B
L. Icamole 1	0.0026 ± 0.0008	0.0027 ± 0.0006	0.0031 ± 0.0008	0.0028 ± 0.0007 C
L. Icamole 2	0.0031 ± 0.0008	0.0040 ± 0.0009	0.0038 ± 0.0010	0.0036 ± 0.0010 D
Total	0.0027 ± 0.0009 A	0.0030 ± 0.0010 B	0.0030 ± 0.0011 B	0.0029 ± 0.0010

Literales en horizontal indican diferencias significativas entre las coloraciones del fruto. Literales diferentes en vertical indican diferencias significativas entre las localidades ($p < 0.05$).

Para las localidades Sierra de Australia y Las Marías a las cuales no se separaron en coloraciones la media general para el peso fue de 0.0039 ± 0.0009 g, teniendo Las Morenas el peso más alto con 0.0040 ± 0.0009 g mientras que Sierra de Australia obtuvo 0.0038 ± 0.0010 g (Figura 3).

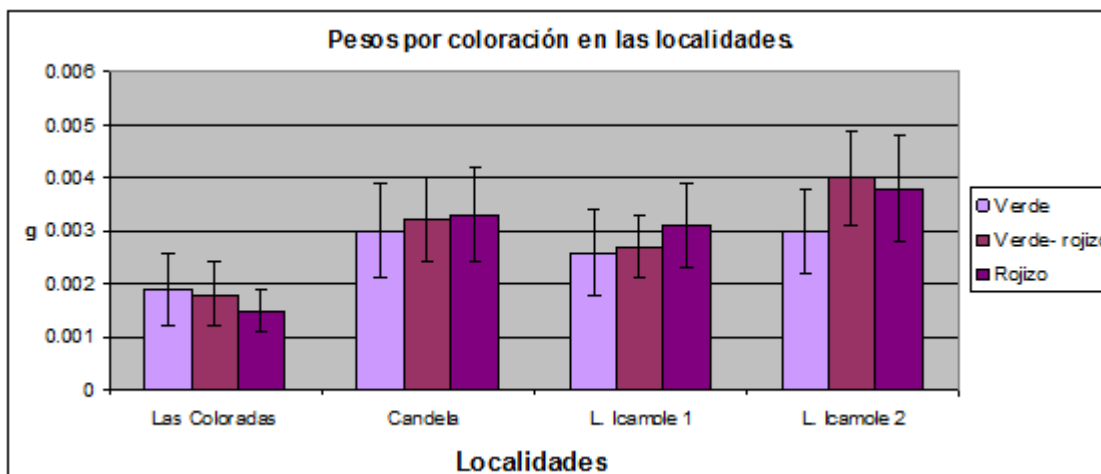


Figura 3. Peso promedio \pm desviación estándar de las semillas separadas por coloración.

Parámetros morfométricos de la semilla

Tabla 9. Valores promedio en mm \pm desviación estándar y comparación múltiple de medias de Tukey correspondientes a los parámetros morfométricos de las semillas.

	LONGITUD (mm)	ANCHO (mm)	GROSOR (mm)
Las Coloradas	2.34 \pm 0.17 A	1.55 \pm 0.13 A	1.53 \pm 0.15 A
Candela	2.51 \pm 0.20 B	1.63 \pm 0.13 A	1.66 \pm 0.10 A
L. Icamole 1	2.82 \pm 0.18 C	1.80 \pm 0.14 A	1.48 \pm 0.41 A
L. Icamole 2	2.20 \pm 0.41 D	1.48 \pm 0.10 A	1.45 \pm 0.10 A
Sierra de Australia	2.41 \pm 0.20 E	1.69 \pm 0.13 A	1.69 \pm 0.12 B
Las Morenas	3.05 \pm 0.24 F	2.11 \pm 0.17 B	1.70 \pm 0.24 B
Total	2.58 \pm 0.35	1.79 \pm 3.28	1.58 \pm 1.25

Literales diferentes indican diferencias significativas entre localidades relación a la longitud, ancho y grosor de la semilla.

Germinación en relación al peso de las semillas

La media general en relación al peso muestra que las semillas de peso bajo presentaron el menor porcentaje de germinación con 13.62%, seguido de peso medio con 18.74% y presentando el mayor porcentaje las de peso alto con 19.40% (tabla 17). El análisis de varianza nos mostró una diferencia altamente significativas ($p=0.00$), mientras que la prueba de comparación de medias de Tukey nos mostró diferencias entre las semillas de peso bajo mientras que las semillas de peso medio (A) y alto son similares (B).

Tabla 17. Valores promedio \pm desviación estándar del porcentaje de germinación en relación al peso de las semillas en las localidades y resultado de la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey.

Peso	Media general
Peso bajo	13.62 \pm 16.07A
Peso medio	18.74 \pm 21.80 B
Peso alto	19.40 \pm 19.96 B

Literales diferentes entre los pesos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los mismos.

La figura 4 muestra el porcentaje de germinación acumulado diario por peso para las localidades de Las Coloradas, Candela, Lomas de Icamole 1 y Lomas de Icamole 2, se observa como el peso alto es el que presenta el mayor porcentaje de germinación seguido del peso promedio con valores muy cercanos.

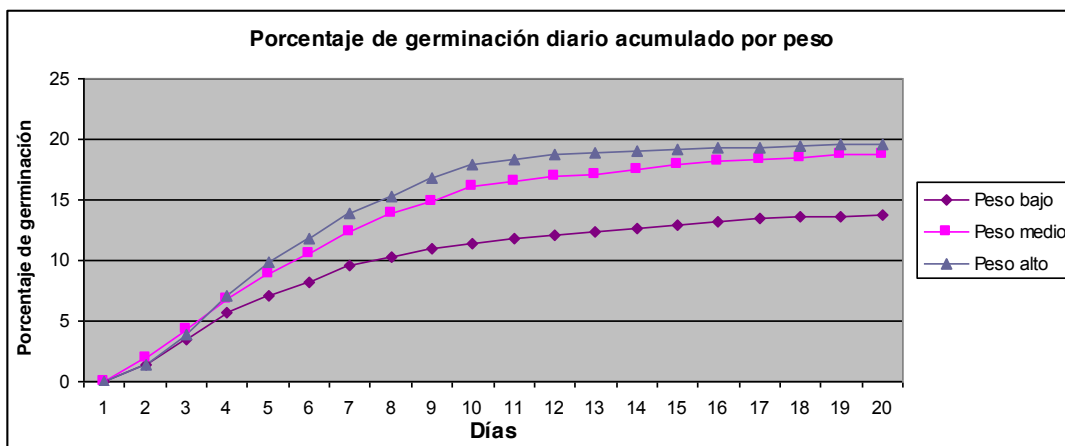


Figura 4. Porcentaje de germinación acumulado diario por peso.

Sierra de Australia fue la localidad que presentó el mayor porcentaje de germinación con 42.66%, mientras que Las Morenas un 30.25%. Se puede observar como el porcentaje de germinación aumenta a mayores pesos en las dos localidades. El Análisis de Varianza nos muestra diferencias altamente significativas ($p=0.00$) entre los pesos en las dos localidades, mientras que la comparación múltiple de medias de Tukey muestra diferencias entre las semillas de bajo peso, pero similitudes entre las de peso medio y alto en ambas localidades así como en el total.

Tabla 18. Valores promedio \pm desviación estándar correspondientes al porcentaje de germinación por pesos de Sierra de Australia y Las Morenas.

Localidad	Peso bajo	Peso medio	Peso alto	Total
Sierra de Australia	34.19 \pm 33.19 A	46.09 \pm 35.23 B	47.70 \pm 31.93 B	42.66 \pm 33.89
Las Morenas	17.99 \pm 20.53 A	34.37 \pm 28.09 B	38.39 \pm 25.66 B	30.25 \pm 26.39
Total	26.09 \pm 28.69 A	40.23 \pm 32.31 B	43.05 \pm 29.25 B	36.46 \pm 30.97

Literales diferentes entre los pesos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los mismos.

CONCLUSIONES

1. El peso de la semilla está directamente relacionado con su viabilidad y capacidad germinativa, ya que semillas de peso medio y alto presentaron el mayor porcentaje de viabilidad y germinación.
2. La coloración del fruto de la semilla es un indicador de la madurez de la semilla sin embargo no se obtuvieron datos concluyentes acerca de la coloración del fruto en la que se presenta la mayor viabilidad y germinación de la semilla, aunque se observó una tendencia en la que semillas provenientes de frutos rojizos serían las que presentarían mayores porcentajes de germinación y viabilidad.
3. El tiempo de almacenamiento de las semillas afecta su viabilidad y germinación, ya que el mayor porcentaje de viabilidad y germinación se obtuvo en semillas almacenadas durante un tiempo mayor a los 5 meses.
4. El porcentaje de viabilidad y germinación varía entre las diferentes localidades (ecotipos), siendo las localidades de Lomas de Icamole 2, Sierra de Australia y Las Morenas las que presentaron los mayores valores.
5. Existe variabilidad genética en las poblaciones ya que el peso, la viabilidad y germinación de las semillas varía entre plantas de la misma localidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Chapa Romo, M. T. 1959. Estudio monográfico de la Candelilla *Euphorbia sp.* Tesis profesional. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Coahuila. Escuela Superior de Agricultura Antonio Narro.
2. Canales E., V. Canales y E. M. Zamarrón. 2006. Cera de Candelilla en La riqueza de los bosques Mexicanos: más allá de la madera. Experiencia en las comunidades rurales. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). pp. 100- 107.
3. De la Cruz J. A. 1958. Contribución al estudio de la Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica Zucc*). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Autónoma de Coahuila. Escuela Superior de Agricultura "Antonio Narro" Buenavista, Saltillo.
4. Esquivel, W. 1979. Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica Zucc*) Estudio monográfico. Tesina Biólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
5. Flores C., E. 1942. La candelilla (*Euphorbia antisyphilitica Zucc*) Tesis Licenciatura. Escuela Nacional Agraria Chapingo, México.
6. Flores López, C. 1995 Viabilidad de las semillas, emergencia de plántulas y plantaciones de Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica Zucc.*) en ramos Arizpe Coahuila. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" División de Agronomía.
7. Rodríguez García, A. 1997. Formación de un Banco de Germoplasma in situ de Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica Zucc*) y Determinación del número cromosómico. Tesis M.C. Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".
8. Wilson Carl L. y W. E. Loomis. 1968. Botánica. UTEHA Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana. México D.F.

METABOLITOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR *RHIZOPUS STOLONIFER* EN MEDIOS NUTRITIVOS CONVENCIONALES Y NO CONVENCIONALES

Ana Guadalupe Abarca-Franco¹, Rosa Isela Ventura-Aguilar^{2*}, Mónica Hernández-López³, Silvia Bautista-Baños³, Laura Leticia Barrera-Necha³.

¹Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad No. 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62209, México. ²CONACYT-³Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla Km. 6, San Isidro Yautepec, Morelos 62731. riventuraag@conacyt.mx

RESUMEN

Se evaluó la habilidad de *Rhizopus stolonifer* como agente productor de metabolitos volátiles a partir de diferentes sustratos. Se utilizó malta como medio nutritivo convencional y jugos de jitomate, fresa y JCV8 como medios no convencionales. 4mL de jugo y 80 μ L de una solución de esporas (10^5 esporas mL⁻¹) de *R. stolonifer* aislado de jitomate y fresa se colocaron en viales de vidrio de 20 mL y se incubaron a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 25 días. Los metabolitos volátiles y el % de CO₂ se cuantificaron por GC/MS y la biomasa por gravimetría. Se utilizó un ANOVA y una prueba de Tukey ($p\leq 0.05$) para el análisis de datos. Los resultados indicaron que *R. stolonifer* aislado de fresa e incubado en jugo de fresa, produjo el mayor número (25-44 metabolitos) y concentración de metabolitos volátiles (3.6×10^9 - 4.8×10^{10} unidades de área bajo la curva). Dentro de los metabolitos destacó la presencia de grupos alcohol y éster. Por otra parte, *R. stolonifer* aislado de fresa incrementó su contenido de CO₂ a través del tiempo en JCV8, mientras que, en los medios de cultivo malta y jugo de fresa el CO₂ disminuyó. No hubo cambios significativos (6.7-10%) con el aislamiento de jitomate e incubado en JCV8 y malta. En relación a la biomasa el hongo mostró un incremento a través del tiempo de incubación independientemente del medio de cultivo y de la cepa evaluada, por lo que, para la obtención de alcoholes y ésteres con aplicaciones industriales, se recomienda utilizar el aislamiento de fresa y como medio nutritivo el jugo de fresa.

INTRODUCCIÓN

Rhizopus stolonifer es un hongo fitopatógeno que crece en diferentes frutas y hortalizas, tales como el jitomate y la fresa, los cuales contienen fundamentalmente carbohidratos y en menor proporción proteínas; nutrientes que son necesarios para el crecimiento del hongo. Con la finalidad de aprovechar la habilidad del género *Rhizopus* para degradar sustratos orgánicos, se han desarrollado estudios *in vitro* utilizando diferentes medios de cultivo, los cuales sustituyen parcialmente las propiedades nutricionales del hospedero o sustrato natural del hongo. El tipo de producto a obtener dependerá de la composición del sustrato. En este sentido, Chan et al. [1] reportaron que al utilizar una mezcla de harina de arroz y esporas de *R. oligosporus*, se produjo una mayor cantidad de alcoholes y ésteres, comparado con los metabolitos emitidos por el hongo en medio papa dextrosa agar.

Por otra parte, *Rhizopus spp.* es un microorganismo con un metabolismo muy acelerado en comparación con otros hongos fitopatógenos, ya que durante su crecimiento *in vitro*, después de tres días cubren prácticamente toda la superficie de la caja Petri a 25°C y presenta un aspecto consistente, con denso micelio aéreo [2]. Además emite metabolitos volátiles que pueden ser aprovechados en diferentes sectores industriales, como alternativa a los compuestos que tradicionalmente se obtienen químicamente. En este sentido, Xin Mei Feng et al. [3] reportaron la presencia de etanol, acetona, acetato de etilo, 2-butanona, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol, como metabolitos volátiles producidos por *Rhizopus oligosporus*, cultivado en extracto de agar de malta (MEA), cebada y soya. Bramorski et al. [4] cultivaron *Rhizopus oryzae* en un medio que contenía bagazo de mandioca y harina de soya, y reportaron que el etanol fue el compuesto más abundante (más del 80%) y en menor proporción se cuantificó el acetaldehído, 1-propanol, acetato de etilo, propionato de etilo y 3-metil butanol.

Además de los metabolitos aromáticos, el género *Rhizopus* se utiliza para la producción de otros productos, tales como, bebidas fermentadas, enzimas como las amilasas, pectinasas, celulasas, proteasas y fitasas y metabolitos como el ácido láctico y el ácido fumárico [5]. Destaca la obtención del ácido láctico en diferentes investigaciones, por ejemplo, Zhan et al. [6] reportaron que *Rhizopus spp.* es un agente productor de ácido láctico, el cual es un ácido orgánico, que es valioso debido a su amplio uso en la formulación de alimentos. Kitpreechavanich et al. [7] identificaron y caracterizaron una cepa de *Rhizopus spp.* termo tolerante y productora de ácido láctico a partir de almidón. Haung et al. [8] produjeron ácido láctico a partir de aguas residuales que contenían fécula de patata utilizando *R. oryzae* y *R. arrhizus*. No obstante, también se ha reportado el uso de *Rhizopus spp.* con el objetivo de aumentar el contenido de polifenoles en fruto de algarrobbillo mediante la técnica de fermentación en estado sólido, como indicó lo Mazo et al. [9]. No obstante, no se ha estudiado el uso del hongo *R. stolonifer* que es el principal agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda, la cual causa pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas que oscilan entre un 50-100 % de la producción nacional. Esto ocurre porque este microorganismo crece en una amplia diversidad de sustratos y en consecuencia su metabolismo podría modificarse en función de su hospedero. El objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento y metabolitos volátiles que produce *Rhizopus stolonifer* aislado de fresa y jitomate, en sustratos comerciales y en jugos de frutas (no comerciales) con diferente composición de carbono y nitrógeno para su uso en la obtención de compuestos con aplicaciones industriales que se obtiene por métodos tradicionales fundamentalmente.

PARTE EXPERIMENTAL

Rhizopus stolonifer se aisló de jitomate y fresa que se adquirieron en expendios comerciales del municipio de Yautepec, Morelos. Las cepa se mantuvo en medio papa dextrosa agar (PDA) durante 30 días a 28 ± 2 °C y a partir de esta se preparó una solución de esporas a una concentración 10^5 , que se empleó durante el ensayo. Asimismo se preparó caldo de malta como medio de cultivo convencional (15 g·L⁻¹, Bioxon) y jugos de jitomate, fresa y JCV8 como medios no convencionales. 4mL de jugo y 80 µL de una solución de esporas (10^5) de *R. stolonifer* aislado de jitomate y fresa se colocaron en viales de vidrio de 20 mL y se incubaron a 28 ± 2 °C por 25 días. Las variables evaluadas fueron los metabolitos volátiles, el contenido de CO₂ y la biomasa.

La cuantificación de los metabolitos volátiles se realizó mediante una técnica de espacio de cabeza utilizando un cromatógrafo de gases de la marca SCION 456-GC (Bruker Daltonics, Billerica, EE.UU.) acoplado a un detector de masas EVOQ triple cuádruple (TQ) y un PAL-COMBI xt (Bruker Daltonics, Inc.). Este sistema fue operado por el software MS Workstation versión 8.2 (Bruker Daltonics, Inc.). El detector de MS fue operado en el modo de exploración que oscilaba entre 50 y 500 masa/carga. El horno de GC fue equipado con una columna capilar BR-1ms de espesor de película de 0.25 mm, (Bruker Daltonics, Inc.) de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno. El inyector se utilizó en modo split y se mantuvo a 250°C y el detector a 230°C. El horno se mantuvo a 40°C durante 20 min, luego se calentó a 8°C·min⁻¹ hasta alcanzar los 250 °C y se mantuvo durante 10 min a esta temperatura. La muestra se incubó a 60 °C durante 20 min y posteriormente se recuperó 1 mL del gas contenido en el espacio de cabeza del vial. La identificación de los compuestos se realizó a partir de la comparación de los espectros de masas contenidos en la biblioteca NIST.

La producción de CO₂ se cuantificó por cromatografía de gases, a partir de 1 mL de gas contenido en el espacio de cabeza del vial [10], empleando un cromatógrafo de gases Agilent series 7800B, equipado con una columna HP PLOT Q y una CP-Molsieve 5A (Grace Vydac Co., Columbia, MD, USA). Se utilizó Helio como gas de arrastre a un flujo de 10 mL·min⁻¹. La temperatura del horno se mantuvo a 40 °C y la del inyector a 210 °C. Los detectores de ionización de flama (FID) y de conductividad termina (TCD) se mantuvieron a 200 y 250°C, respectivamente. El tiempo de retención del CO₂ fue de 2.6 minutos.

La cuantificación de biomasa se llevó a cabo por gravimetría filtrando la mezcla (hongo + medio de cultivo) contenida en el vial [11]. Se utilizó un ANOVA y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para el análisis de datos.

RESULTADOS

Metabolitos volátiles

No se observó una tendencia clara en el número de compuestos volátiles producidos durante el crecimiento del hongo, independientemente del sustrato empleado. A pesar de esto, *R. stolonifer* aislado de fresa fue el que produjo el mayor número de compuestos volátiles comparado con *R. stolonifer* aislado de jitomate, particularmente al utilizar como sustrato malta (medio convencional) y JCV8 (medio no convencional).

Por otra parte, se cuantificó el mayor contenido de metabolitos volátiles al utilizar como sustrato el jugo de jitomate y de fresa (3.078×10^{-10} unidades de área) con respecto a los medios de cultivo restantes (6.48×10^{-8} unidades de área). Bramorski et al [4] y Xin Mei Feng et al.[3] indicaron que la producción de metabolitos volátiles depende del sustrato y de la cepa del hongo. Asimismo a través de los resultados podemos concluir que la producción de metabolitos volátiles fue mayor al utilizar medios de cultivo no convencionales, como los jugos de fresa y jitomate, los cuales son los hospederos naturales en donde *R. stolonifer* crece con una mayor severidad y frecuencia.

Cuadro 1. Número de metabolitos volátiles emitidos por *R. stolonifer* aislado de fresa y jitomate y crecido por 25 días en medios líquidos convencionales y no-convencionales.

Medios de cultivo	Días de crecimiento			
	5		25	
	RJ	RF	RJ	RF
JCV8	34	36	42	20
JF	41	----	25	
JJ	----	46	----	27
Malta	37	30	23	28

JCV8 (jugo comercial V8), JF (jugo de fresa), JJ (jugo de jitomate), RF (*R. stolonifer* aislado de fresa), RJ (*R. stolonifer* aislado de jitomate)

Los principales metabolitos volátiles producidos por *R. stolonifer* aislado de fresa o jitomate se presentan en el Cuadro 2. Destaca la presencia de 2-metil-1-butanol, el cual puede ser utilizado como biocombustible, también está presente el pentanol que se utiliza en la fabricación de lacas, pinturas, barnices, decapantes, caucho, plásticos, explosivos, líquidos hidráulicos, pegamentos para calzado, perfumes, productos químicos y farmacéuticos, y en la extracción de grasas [12]. Finalmente se encontró la presencia de 2,4-Di-tert-butilfenol, utilizado ampliamente en las industrias de plásticos y en la fabricación de productos farmacéuticos y fragancias [13].

Cuadro 2. Principales compuestos volátiles emitidos por *R. stolonifer* procedente de fresa y jitomate durante 25 días, incubados a 28±2°.

	Día 5		Día 25			Día 5		Día 25			
	RF	RJ	RF	RJ		RF	RJ	RF	RJ		
Malta	1-Butanol, 2-metil-	*		*	Jugo de jitomate	Ácido 10-bromodecanoico, éster etílico		++			
	2,4-Di-tert-butilfenol	*	++	*		2,4-Di-tert-butilfenol		++		++	
	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-metil-5-(1-metiletil)-	*		*		Ácido benzoico, éster metílico		++			
	Oxirano, 2-(1,1-dimetiletil)-3-metil-	*	++			++	Camfeno		++		++
	Ácido benzoico, éster metílico	*		*		++	.alfa.-Terpineol				*
	Camfeno		++	*		++	1-Butanol, 2-metil-				*
							Ácido benzoico, éster metílico				*
JCV8	.alfa.-Terpineol	*	++	*	++	Jugo de Fresa	Ácido acético, 2-feniletil éster			*	
	(E)-1-Metil-4-(6-metilhept-5-en-2-ylidene)ciclohex-1-ene	*	++	*	++		Ácido dodecanoico, éster etílico	*			*
	2,4-Di-tert-butilfenol		++		++		Ácido Decanoico, éster etílico	*			*
	Ácido benzoico, éster metílico	*	++	*			Etil (Z) - cinnamato	*			*
	1-Butanol, 2-metil-	*					Ácido pentanoico, 3-metil-4-oxo-	*			*
	1-Decanol, 2-hexil-				*		Ácido acético, hexil éster	*			*
	Camfeno	*	++	*	++		Camfeno	*			*

RF: *Rhizopus* aislado de fresa; RJ: *Rhizopus* aislado de jitomate

Efecto de la composición del sustrato en el contenido de CO₂ emitido por R. stolonifer

Respecto a la producción de CO₂ del hongo *R. stolonifer* en medio de cultivo convencional (malta) y no convencionales como JCV8, jugo de fresa y jugo de jitomate, se observó que *R. stolonifer* aislado de fresa modificó su contenido por efecto del medio de crecimiento ($p \leq 0.05$); mostrando un incremento a través del tiempo en la producción de CO₂ al crecer en el JCV8. Por el contrario en los medios de cultivo malta y jugo de fresa la producción de CO₂ disminuyó a través del tiempo (Cuadro 3). Mientras que *R. stolonifer* aislado de jitomate y crecido en JCV8 y malta presentó un contenido de CO₂ sin cambios significativos ($p \leq 0.05$), con excepción de las determinaciones en el jugo de jitomate, donde su producción de CO₂ disminuyó a través del tiempo. Esta disminución en la tasa respiratoria (producción de CO₂) podría asociarse con una pérdida en su actividad metabólica.

Los resultados coinciden con los reportados por Peralta [14] quien utilizó diferentes sustratos para crecer microorganismo como *S. cerevisiae* y encontró que cuando predomina la glucosa, sacarosa, fructosa, azúcar mascabado y Splenda, la producción de CO₂ alcanzó mayores concentraciones (100,000 ppm). Sin embargo otros sustratos como maltosa y lactosa alcanzaron las menores concentraciones (23700 y 1400 ppm, respectivamente).

Cuadro 3. Contenido de CO₂ de *R. stolonifer* incubado en diferentes medios de cultivo (malta, JCV8, jugo de fresa), los días 5 y 25 a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Medio de cultivo	Día 5	Día 25
Malta RF	7.24 ± 2.96	6.88 ± 0.33
Malta RJ	7.50 ± 0.66	10.45 ± 0.39
JCV8 RF	4.63 ± 1.11	10.80 ± 2.82
JCV8RJ	7.27 ± 1.15	9.08 ± 0.62
Jugo fresa RF	0 ± 0.32	2.66 ± 0.26
Jugo jitomate RJ	11.17 ± 2.76	1.27 ± 0.94

RF= *Rhizopus stolonifer* aislado de fresa, RJ= *Rhizopus stolonifer* aislado de jitomate

Efecto de la composición del sustrato en el contenido de CO₂ emitido por R. stolonifer

Con relación al contenido de biomasa este se modificó ($p \leq 0.05$) por efecto del medio de cultivo y a través del tiempo, pero no por efecto del sustrato del que se aisló (jitomate / fresa). En este sentido, el JCV8 fue el sustrato que favoreció la producción de biomasa siendo de 4 a 5 veces mayor en comparación con el medio de cultivo malta y jugo de jitomate, y de 2 a 3 veces mayor con respecto al jugo de fresa. Finalmente la biomasa incrementó a través del tiempo, independientemente del medio de cultivo y de la cepa de *R. stolonifer* utilizada.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados por los reportes de Taherzadeh et al. [15] quienes indicaron que la composición del medio tiene un efecto notable sobre la biomasa producida por *R. oryzae*, reportando un contenido de $0.2 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ de sustrato después de 14 días a 30°C , crecido en un medio sintético el cual contenía $7.5 \text{ g L}^{-1}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $3\text{-}5 \text{ g L}^{-1} \text{KH}_2\text{P}_4$, $0.74 \text{ g L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g L^{-1} de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mL L^{-1} de la solución de trazas de metal y 0.7 mL de una solución de vitaminas con 50 g L^{-1} de glucosa como fuente de carbono y energía; esto comportamiento fue observado debido a que el género *Rhizopus* asimila las hexosas rápidamente.

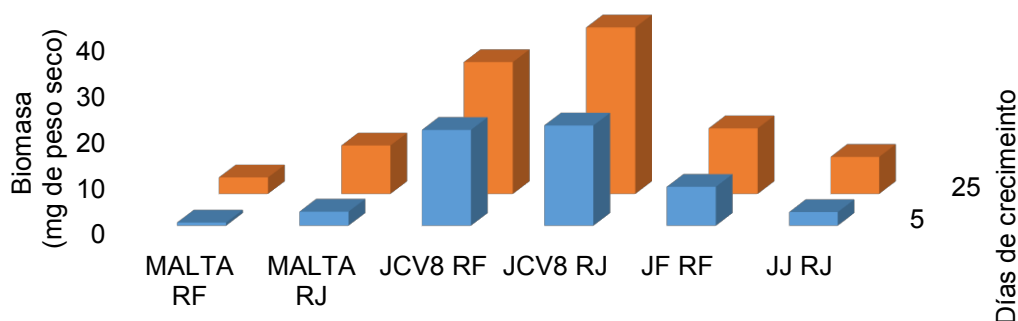


Figura 2. Contenido de Biomasa de *R. stolonifer* aislado de frutos de jitomate y fresa e incubado en diferentes medios de cultivo: Caldo extracto de malta (malta), jugo comercial V8 (JCV8), jugo de fresa (JF), Jugo de jitomate (JJ), los días 5 y 25 a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

CONCLUSIONES

El hongo *Rhizopus stolonifer* produce diferentes metabolitos volátiles de interés industrial, sin embargo el medio de cultivo tiene una gran influencia. El mayor contenido y número de metabolitos se produjo al crecer *R. stolonifer* aislado de fresa en jugo de fresas obteniéndose 2-metil-1-butanol, y pentanol como metabolitos con aplicaciones en el área química y alimentaria.

REFERENCIAS

1. W.C. Vong, X.Y. Hua, S.Q. Liu, "Solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Yarrowia lipolytica* improved nutritional and flavour properties of okara". *LWT*, Vol.90, 2017, pp. 316-322
2. G. Laufenberg, B. Kunz, M. Nystroem. "Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations". *Bioresource Technology*. Vol.87 (2), 2003, pp.167-198.
3. T. X Feng, T.O Larsen, J. Schnürer. "Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation". *International journal of food microbiology*, Vol. 113,2 2007, 133-141.
4. A. Bramorski, P. Christen, M. Ramirez, C. R. Soccol, S. Revah. "Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates". *Biotechnology letters*, vol.20, 4,1998, pp. 359-362.
5. L. S. Cock & A. Rodríguez. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado do arte. *CYTA Journal of Food*. Vol. 5, 1, 2005, pp. 54-6.
6. Z.Y. Zhang, B. Jin, J.M. Kelly. "Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi". *Biochemical Engineering Journal*, Vol.35, 3, 2007, pp. 251-263.
7. V. Kitpreechavanich, T. Maneeboon, T. Kayano, K. Sakai. "Comparative characterization of L-lactic acid-producing thermotolerant *Rhizopus* fungi". *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol. 106,6, 2008, pp. 541-546.
8. L. P. Huang, B. Jin, P. Lant, J. Zhou. "Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*". *Biochemical Engineering Journal*. Vol.23, 3, 2005, pp 265-276.
9. J.E. Mazo, D. Cantillo, K Rodríguez, J.A Yepes, "Aumento de Polifenoles en el Sustrato de Algarrobito (*Samanea saman* (Jacq.) Merr.) mediante Fermentación en Estado Sólido con *Rhizopus sp* (CMPUJ H041)". *Información tecnológica*, Vol. 27,6, 2016, pp.77-84.

10. M. Vogt., C. Brüsseler., J. van Ooyen., M. Bott., J. Marienhagen. "Production of 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol in engineered *Corynebacterium glutamicum*". *Metabolic engineering*, Vol.38, 2016, pp. 436-445.
11. Y. Ishikawa., T. Hirata., Y. Hasegawa. "Development of simple gas permeability measurement for polymeric films on high gas permeability films for MA packaging of fresh produce". *J Packag Sci Technol*. 1997, pp.213–20.
12. C. E Oshoma, M. J. Ikenebomeh. "Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran"., *Pakistan Journal of Nutrition*, Vol. 4, 1, 2005, pp. 32-36.
13. S. Belghit., E.H. Driche., C. Bijani.,A. Zitouni., N. Sabaou., B. Badji, F Mathieu. "Activity of 2, 4-Di-tert-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi". *Journal de mycologie medicale*, vol. 26, 2, 2016, pp. 160-169.
14. N. Peralta. "Efecto del sustrato en la liberación de CO₂ por: *Saccharomyces cerevisiae*". 2016.
15. M.J Taherzadeh., M. Fox., H. Hjorth., L. Edebo. "Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*". *Bioresource technology*, Vol.88, 3 , 2003, pp.167-177.

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE PARED DE CONIDIAS DE TRICHODERMA SPP POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Lilia Yunuen Salazar Alcantar y Virginia Angelica Robinson Fuentes

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

Trichoderma spp es un hongo microscópico de amplia distribución y es muy estudiado ya que tiene una gran capacidad metabólica. Es utilizado para la producción de enzimas industriales como pigmentos y quinonas, así como para la producción de más de 100 metabolitos con actividad antibiótica; también es ampliamente utilizado como control biológico. Algunas especies han resultado ser patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, provocando que estén expuestos a sufrir algún tipo de micosis. Por todo lo anterior, es necesario que la identificación de los microorganismos sea más rápida, sensible y más selectiva. En años recientes se ha propuesto a la electroforesis capilar (EC) como una técnica alternativa para este fin ya que nos permite conocer las propiedades de adherencia y repulsión que presentan las conidias a superficies y otras células. En este trabajo se utiliza la EC para estudiar algunas propiedades de superficie de conidias de *Trichoderma spp*. Se utilizó una mezcla de dos géneros fúngicos: *Agaricus bisporus* y *Trichoderma atroviride*. El BGE (buffer de corrimiento) usado fue HEPES 20mM a pH 7 y como aditivos CTAB y β -CDs. El capilar es de 100 μ m d.i., T= 25°C y 17 KV, en polaridad normal. Equipo: Beckman Coulter P/ACE MDQ system. Los electroferogramas obtenidos al usar HEPES 20mM, pH 7, mostraron múltiples señales en los corrimientos individuales de cada género fúngico. La incorporación de β -CDs, ocasionó la mejora de las señales electroforéticas de ambos géneros. Con CTAB como aditivo en el BGE, se lograron agrupar las conidias y tener señales más definidas. El uso de aditivos en el BGE mejora las señales electroforéticas obtenidas para cada uno de los géneros fúngicos analizados lo que indica la interacción que tienen los grupos funcionales de la pared celular con los aditivos.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucarióticos, aerobios y heterótrofos, pueden ir desde organismos unicelulares hasta pluricelulares macroscópicos. Su alimentación es por medio de una digestión externa y posterior ingesta de nutrientes. Podemos encontrarlos ampliamente en el medio ambiente, contaminando el aire, suelo y alimentos [López et al, 2006; Fischer y Kues, 2006; Egbuta et al, 2017]. Desarrollan un papel fundamental en términos ecológicos, ya que son los principales descomponedores y transformadores de la materia orgánica. De acuerdo con el papel que desempeñan en la naturaleza se pueden clasificar en saprobios, mutualistas y micoparásitos [Manson, 2008; De Bary, 2008; Badii et al, 2013; Osorio-Hernández, 2009].

Trichoderma es un hongo filamentoso que forma parte de la microbiota del suelo de diferentes ecosistemas en una amplia gama de zonas climáticas, se caracterizan por ser hongos saprofitos donde actúan como descomponedores de materiales lignocelulósicos de madera, ramas y hojas caídas [Klein y col, 1998; Infante et al, 2009]. Es utilizado para la producción de enzimas industriales como pigmentos y quinonas así como para la producción de más de 100 metabolitos con actividad antibiótica y es ampliamente utilizado como control biológico [Ortuño y col, 2013; Klein y col, 2002]. Las enzimas producidas por *Trichoderma* son utilizadas por la industria alimentaria para la degradación de polisacáridos complejos, en la producción y transformación de alimentos, como es el caso de α -glucanasas utilizadas para mejorar los procesos de elaboración de la cerveza. Las pectinasas, celulasas, hemicelulasas se emplean para la maceración de enzimas en la producción de jugos de fruta; las xilanasas son utilizadas como aditivo para piensos en la cría de ganado y para alimento de mascotas [Blumenthal, 2004; Schuster, 2010].

El género *Trichoderma* se emplea como control biológico en el estudio de hongos fitopatógenos ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas, produciendo metabolitos antifúngicos como gliotoxina, gliovirina, viridina, así como metabolitos volátiles o solubles que afectan de manera negativa el desarrollo de los patógenos, entre ellos *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinérea* que son plagas de cientos de cultivos vegetales como los tomates, pepinos, fresas, algodón y uvas,

continuando con una fagocitosis del contenido celular [Argumedo-Delira, 2009; Stefanova y col, 1999; Osorio-Hernández, 2009].

Algunas especies de *Trichoderma* como *T. estonicum* son empleados para la producción de bioetanol realizando hidrólisis de residuos lignocelulósicos, para obtener de manera accesible los azúcares contenidos en sus fibras y lograr la obtención de alcohol de segunda generación por sacarificación [Saravanakumar et al, 2014].

A pesar de tener funciones con grandes beneficios y altamente productivas para los seres humanos, también ha sido reportado como agente patógeno oportunista en humanos inmunocomprometidos, causando desde problemas respiratorias hasta un absceso cerebral en paciente leucémico, como es el caso de *T. longibrachiatum* [Seguin, 1995; Ranque y col, 2008].

En la actualidad, los hongos filamentosos potencialmente patógenos para el hombre han sufrido un aumento excesivo, convirtiéndose en una causa importante de infecciones nosocomiales con una elevada tasa de mortalidad, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, como son aquellos que han recibido un trasplante de órganos o que padecen alguna enfermedad, incluso SIDA, estando expuestos a sufrir algún tipo de micosis. De igual manera el uso indiscriminado que se les da a los antimicóticos les confiere a las cepas una mayor resistencia a este tipo de medicamentos [James y col, 2006; Horka y col, 2009; Hoyos-Carbajal, 2011].

Debido a este problema se vuelve necesario que la identificación de estos microorganismos sea más rápida, más sensible y más selectiva [James y col, 2006; Horka y col, 2009].

Existen diferentes técnicas utilizadas para la identificación de hongos microscópicos, siendo la más utilizada el cultivo y la observación, pero en años recientes se ha propuesto a la Electroforesis Capilar como una técnica alternativa para lograr esta identificación, gracias a la gran cantidad de información que brinda de estos microorganismos, permitiendo conocer las propiedades de pared celular [Bao y col, 2008].

La electroforesis capilar es una técnica analítica que tiene como función provocar el movimiento o desplazamiento de moléculas cargadas (iones) y sustancias neutras, utilizando un campo eléctrico aplicado que provoca su movimiento en el interior de un capilar. Es una técnica poco utilizada en el estudio de hongos filamentosos; sin embargo, permite conocer las propiedades de adherencia y repulsión que presentan las conidias a superficies y otras células, entre otras propiedades importantes [Horka y col, 2009; Horka y col, 2012].

Son pocos los estudios que se han realizado para lograr la identificación de células fúngicas utilizando la EC tal es el caso de Horka y col., que en el año 2009 lograron separar una mezcla de conidias de cinco géneros fúngicos, utilizando la ECZ, obteniendo señales electroforéticas con una buena resolución en la separación al realizar la modificación de conidias utilizando PB-PEG. Para el año 2011, el mismo equipo de Horka y col., lograron separar una mezcla de cuatro especies del género *Monilinia*.

En el Laboratorio de Desarrollo Analítico se ha utilizado la EC como una técnica para lograr la identificación de células fúngicas. Como es el caso de Cazares en el 2009, utilizando la ECZ logro caracterizar conidias de *Trichoderma atroviride* y *Agaricus bisporus*, obteniendo señales electroforéticas con una excelente resolución. Salazar en el 2014, evaluó el efecto de surfactantes iónicos y no iónicos en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp*, utilizando como técnicas la EC y microelectroforesis, pudiendo observar que aditivos como CTAB y Triton X100 ejercen un efecto en la movilidad y agrupación de las conidias, obteniendo buenas señales electroforéticas. En el 2016, Gallegos evaluó el uso de buffers zwitteriónicos en cuatro cepas silvestres y una de referencia del género *Trichoderma*, logrando caracterizarlas en corrimientos individuales, al utilizar las mismas condiciones en un análisis en mezcla de las cuatro especies, se pudo observar que existe la posibilidad de lograr la separación de las señales electroforéticas correspondientes a cada especie. Por lo que en este estudio se busca optimizar las condiciones electroforéticas empleando diferentes buffers y aditivos, para lograr una separación e identificación de señales electroforéticas correspondientes a cada especie, analizando una mezcla de conidias de diferentes géneros fúngicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de la muestra

Se utilizó mezcla de dos géneros fúngicos: *Agaricus bisporus* y *Trichoderma atroviride*.

Para obtener las células fúngicas se utilizaron los siguientes protocolos para cada género fúngico: ***Trichoderma atroviride***: Se sembró en medio mínimo Vogel y se incubó a 25°C por 70h. Después de 72 h se realiza un daño mecánico para inducir la conidiación. Transcurridas 120h., las conidias se recuperan utilizando 2.5mL de agua destilada estéril. La suspensión obtenida se lleva a vortex por 5min, se procede a realizar tres lavados utilizando la centrifuga a 13300g por 10min. Se recupera el sedimento y se resuspende en H₂O destilada estéril.

Agaricus bisporus: Se procedió a remover todas las laminillas del hongo y fueron colocadas en tubos para centrifuga de 10 mL, a los que se le adicionó H₂O destilada suficiente para llenarlos y realizar lavados. Fueron llevados a vortex por 3 min para que se desprendieran las esporas de las laminillas. Posteriormente se llevaron a centrifugación a 4500rpm por 10 min, después de la centrifugación las esporas quedan sedimentadas en el tubo y las laminillas quedan suspendidas en el sobrenadante por lo que se eliminan los sobrenadantes de todos los tubos. Los sedimentos fueron resuspendidos en H₂O destilada y se realizaron varios lavados hasta obtener el H₂O clara. Posteriormente se filtró la solución utilizando una gasa para eliminar los restos de laminilla y obtener la suspensión de esporas en H₂O estéril.

Para realizar la mezcla de los dos géneros fúngicos, *Trichoderma atroviride* y *Agaricus bisporus*, se tomaron 200µL de cada una de las suspensiones y se llevaron a Vortex por 5 min. A la mezcla resultante se le adiciona buffer de corrimiento para tener una dilución final en proporción 2:3.

Buffer y aditivos: Los aditivos utilizados fueron modificadores de FEO (CTAB), surfactantes (CTAB) y selectores quirales (α-ciclodextrinas), con una concentración cercana a su CMC.

Condiciones electroforéticas: El BGE (buffer de corrimiento) usado fue HEPES 20mM a pH 7. El capilar es de 100 µm d.i., T= 25°C y 17 KV, en polaridad normal. Equipo: Beckman Coulter P/ACE MDQ system.

RESULTADOS

Los corrimientos electroforéticos realizados para el análisis de la mezcla de conidias de *Trichoderma atroviride* y *Agaricus bisporus*, utilizando como BGE HEPES 20mM a pH 7, mostraron múltiples señales sin tener una buena resolución entre ellas (Fig. 1).

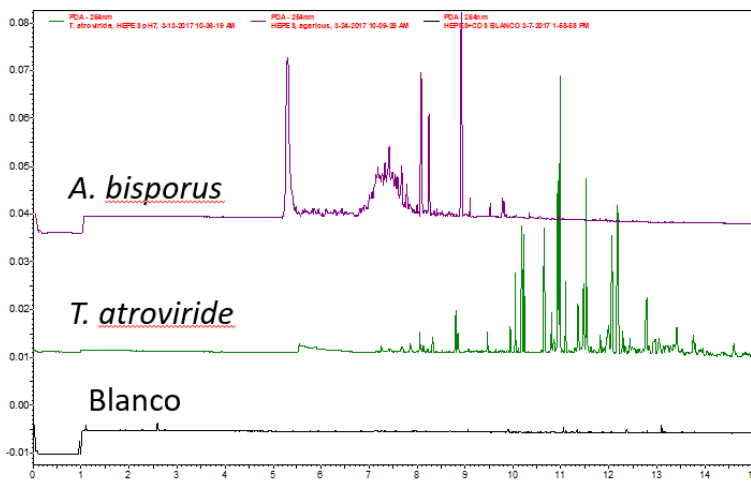


Figura 1. Corrimientos individuales de *T. atroviride*, *A. bisporus*, buffer HEPES 20mM pH 7.

Al utilizar como aditivo las α-Ciclodextrinas en la misma mezcla mencionada anteriormente, se obtuvo una mejoría en las señales electroforéticas; sin embargo, aún no se logra separar las señales electroforéticas correspondientes a cada una de las especies fúngicas (Fig. 2).

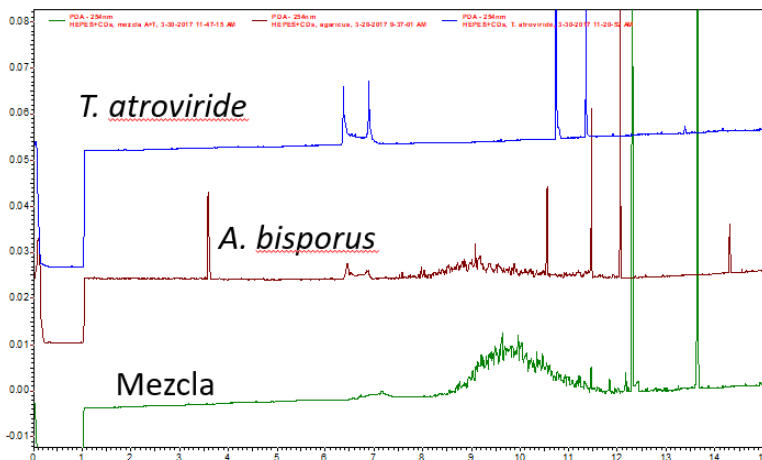


Figura 2. Corrimientos electroforéticos individuales y en mezcla de *A. bisporus* y *T. atroviride*, buffer HEPES 20mM con adición de β -CDs.

Las β -ciclodextrinas pertenecen al grupo de modificadores quirales nunca han sido utilizados en el análisis de células fúngicas, únicamente en la separación enantiomérica de moléculas químicas, como agentes solubilizantes para aceites volátiles hidrofóbicos, entre otros (Velásquez, 2010; Alzate, 2012). Interactúan con moléculas y/o grupos funcionales interactuando por su cavidad por medio de puentes de H; dentro del capilar estas podrían interactuar con el β -1,3-glucano (Fig. 3) al ser un compuesto orgánico y componente principal de la pared celular fúngica [Castagnino, 2002; Ponton, 2008]. Otro componente de la pared celular son las hidrofobinas proteínas de superficies ricas en cisteína y propias de los hongos filamentosos, que se caracterizan por brindar el carácter hidrofóbico a la pared celular fúngica. Dicho efecto podría favorecer la interacción con la β -CDs ya que estas también tienen un carácter hidrofóbico en su cavidad y al interactuar con un huésped hidrofóbico desplazan las moléculas de agua que contienen favoreciendo su interacción con la pared y se vuelve un complejo mucho más estable [Sandoval, 2011; Martínez, 2007].

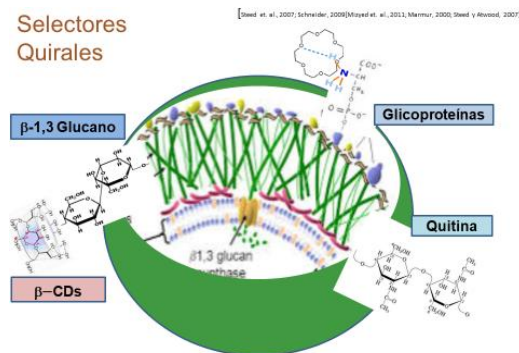


Figura 3. Componentes de la pared celular fúngica interactuando con β -CDs.

Al utilizar como aditivo el CTAB adicionado al BGE, en el análisis de la mezcla de *Agaricus bisporus* y *Trichoderma atroviride*, se obtuvieron señales electroforéticas estrechas (Fig. 4). Aún falta mejorar la separación de ambos géneros fúngicos.

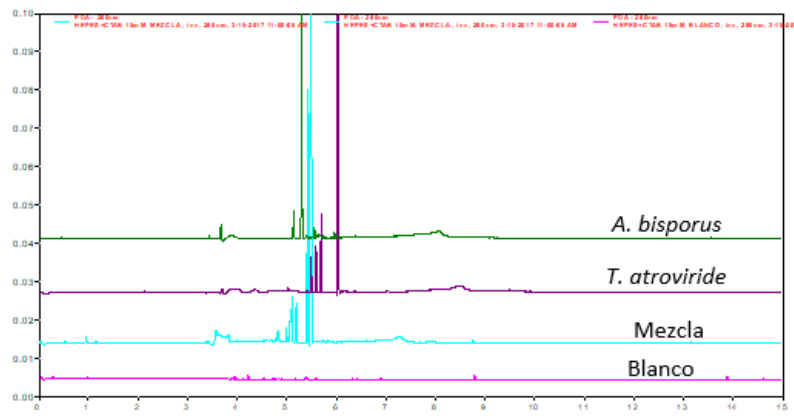


Figura 4. Corrimientos electroforéticos de mezcla *A. bisporus* y *T. atroviride*, buffer HEPES con adición de CTAB 25mM.

Al utilizar como aditivo el CTAB adicionado al BGE, en el análisis de la mezcla de *Agaricus bisporus* y *Trichoderma atroviride*, se obtuvieron señales electroforéticas estrechas pero no se logró identificar ni separar las que correspondieran a cada especie (Fig. 5). Esto puede atribuirse al efecto que causa el utilizar este surfactante, ya que las conidias en presencia de CTAB tienden a agruparse, como fue reportado por Salazar (2015), de acuerdo a las señales que se obtuvieron, indica que la agrupación se presenta sin importar que pertenezcan a dos especies diferentes.

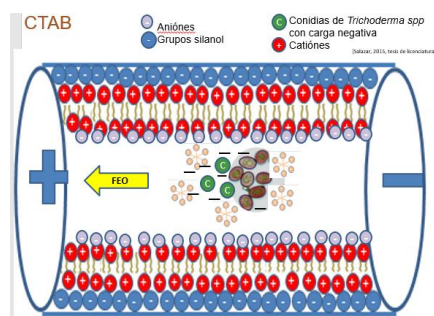


Figura 5. Posible interacción de *Agaricus bisporus* y *Trichoderma atroviride* en presencia del surfactante catiónico CTAB en el interior del capilar.

CONCLUSIÓN

El uso de aditivos en el BGE mejora las señales electroforéticas obtenidas para cada uno de los géneros fúngicos analizados lo que indica la interacción que tienen los grupos funcionales de la pared celular con los aditivos.

REFERENCIAS

1. Horka M, Ruzicka F, Kubesova A, Hola V, Slais K. 2009. Capillary electrophoresis of conidia from cultivated microscopic filamentous fungi. *Analytical chemistry*. 81(10):3997-4004.
2. Horka M, Kubesova A, Salplachta J, Zapletalova E, Horky J, Slais K. 2012. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS--suitable tools for identification of filamentous fungi. *Analytica chimica acta*. 716:155-62.
3. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443:818-22.
4. Klein D, Eveleigh DE. 2002. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Pennsylvania, EUA: Taylor and Francis. 57-74.

5. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F, Castañón Olivares R. 2006. Micología médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 2ª edición ed. México, D.F.: Editorial Trillas; 192 p
6. Manson RH., Hernández-Ortiz V., Gallina S., Mehlreter K. 2008. Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz. Biodiversidad, Manejo y Conservación. (14), 193.
7. Martínez G., Gómez MA. 2007. CICLODEXTRINAS: COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON POLÍMEROS. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, C.S.I.C. Revista Iberoamericana de Polímeros. 8(4).
8. Ortuño N., Miranda C., Claros M. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. Generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. Artículo de Investigación. Journal of the selva Andina Biosphere; 16-19.
9. Ponton J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micología. (25):78-82.
10. Ranque S, Garcia-Hermoso D, Michel-Nguyen A, Dumon H. Isolation of *Trichoderma atroviride* from a liver transplant. 2008. Journal de Mycologie Medicale. (8):234-236.
11. Salazar-Alcantar LY. Influencia de surfactants en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma* spp. 2015. Tesis de Licenciatura en QFB. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. Schwartz H, Guttman A. 2004. Separation of DNA by Capillary Electrophoresis. Beckman instruments, Inc. Palomal Analytical Services. Redwood city, ca. pág. 1-15.
12. Sandoval-Vega MC., Noelting-Zenobio MCI. 2011. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI EN DOS MEDIOS DE MULTIPLICACIÓN. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Fitosanidad 15(4) 215-221
13. Saravanakumar K., Kathiresan k. 2014. Bioconversion of lignocellulosic waste to bioethanol by *Trichoderma* and yeast fermentation. 4(5): 493–499
14. Seguin P, Degeih B, Grulois I, Gacouin A, Maugendre S, Dufour T, Dupont B, and Camus C. 1995. Succesful treatment of brain Abscess due to *Trichoderma longibrachatum* after Surgical Resection. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. (14):445-448.
15. Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., y Coronado, M.F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía (Luz) 16:509-516

CONTROL DE CENICILLA POLVORIENTA EN FRIJOL BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉ DE COMPOSTA

Fernández Rivera Elizabeth, Rodríguez González Norma Cristina, Oyoque Salcedo Guadalupe y Zamudio Oregel Ernesto

Instituto Politécnico Nacional

RESUMEN

El frijol es uno de los cultivos más importantes en nuestro país ubicándose en segundo lugar por superficie destinada, la mayor importancia radica en el papel que juega para la economía campesina y como fuente vital de proteínas para la dieta de los mexicanos. Sin embargo, a pesar de ser un producto tan necesario, la producción del frijol en México es sensible a las condiciones climáticas que se presentan durante el año agrícola, así como las inercias que se han acumulado por largos años. En Michoacán el cultivo de frijol, en 2017 se vio disminuida en un 10% respecto al periodo 2015 esto debido a la incidencia de enfermedades en el cultivo siendo cenicilla polvorienta (*Erysiphe polygoni*) una de las principales. El uso indiscriminado de productos químicos para el control de enfermedades, ha provocado una disminución en la fertilidad de los suelos ocasionando problemas severos en el desarrollo y producción de la mayoría de los cultivos, dejándolos más susceptibles a enfermedades, reduciendo así la calidad de los productos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la aplicación de diferentes dosis (2.5, 5 y 7mL) de TÉ de composta, en sustrato y a manera foliar, para el control de cenicilla inoculada en plantas de frijol. Se evaluó mediante una escala de severidad (nivel 1= sana, nivel 3= planta completa con síntomas), y evaluando la incidencia, dando como resultado que los tratamientos con aplicación foliar de Té de composta se presentó una disminución en incidencia y severidad de la misma el tratamiento optimo fue el de 7 mL aplicados a nivel foliar con una incidencia de 3.05% en contraste con los testigos de un 26.19%. Lo que permite concluir que el Té de composta es una buena opción para el control de enfermedades.

INTRODUCCIÓN

México, ocupa el cuarto lugar como productor de frijol a nivel mundial, después de la India, Brasil y China. Sin embargo, nuestro país necesita grandes cantidades de frijol anualmente y para ello se requiere aumentar la productividad y producción (FIRA, 2016), pues en México el grano de frijol por su alto contenido de proteína es básico para la alimentación de su población y ocupa el segundo lugar en importancia nacional después del maíz. No obstante, el frijol al igual que otros cultivos es afectado por distintos microorganismos que ocasionan enfermedades de origen fúngicas como la roya *Uromyces phaseolus* f. sp. *typica* Arth; cenicilla polvorienta *Erysiphe polygoni*; marchitamientos por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*; *Rhizoctonia solani* Kuhn, entre otras enfermedades de origen bacteriano y viróticas (Ramírez, 2011).

La cenicilla polvorienta ataca directamente a través de la epidermis formando haustorios, los síntomas más comunes hojas cloróticas muy tenues y posteriormente colonias de aspecto polvoso (conidias y conidioforos). Las estructuras pueden cubrir haz y envés, extendiéndose a pecíolos y tallos. La apariencia polvosa la proporciona el micelio y las esporas presentes en la superficie de las áreas afectadas. Las plantas con tallos dañados se tornan cloróticas y achaparradas. (Petrokov, 2016).

Para el control de estas enfermedades se utiliza una gran cantidad de agroquímicos que se emplean constantemente, A este respecto, los suelos que son la fuente generadora de los alimentos a nivel mundial, son vulnerables a los procesos de degradación, desertificación y su efecto en los ecosistemas que sustentan. Por lo tanto, se busca tener alternativas naturales para el control de enfermedades llegando a un ambiente sustentable de manera natural. Los fertilizantes orgánicos ejercen un efecto multilateral sobre las propiedades agronómicas de los suelos y, cuando se utilizan correctamente, elevan de manera adecuada la cosecha de los cultivos agrícolas. Por tales razones, se justifica la evaluación de alternativas naturales, tales como residuos de cosecha, estiércol, abonos verdes y composta, para incrementar tanto el rendimiento como los niveles de materia orgánica en el suelo. Por los efectos favorables que los abonos orgánicos proporcionan al suelo, éstos pudiesen ser imprescindibles en el uso y manejo de este recurso para mejorar y mantener su componente

orgánico, sus características de una entidad viviente, su fertilidad física, química y biológica y finalmente su productividad (SAGARPA, 2017).

Los efectos benéficos del té de composta han sido demostrados, pero la mayoría de las respuestas han sido a prueba y error. El té de composta, puede utilizarse como fertilizante, debido a que contiene nutrimentos solubles, microorganismos benéficos y compuestos favorables para las especies vegetales. Esta solución puede ser aplicada a través de sistemas de riego presurizado, por lo que su uso puede adaptarse en sistemas de producción orgánica de cultivos bajo condiciones de invernadero. El té de composta se ha utilizado para prevenir enfermedades, tanto en aspersión foliar como aplicado al sustrato utilizaron un fertilizante orgánico a base de té de composta proveniente de gallinaza, para producir tomate en invernadero, con lo que obtuvieron rendimientos de 4 kg/planta más, comparado con la fertilización convencional. Con base a estos antecedentes el presente trabajo tiene el objetivo de evaluar el uso de té de composta en uso foliar y de manera a sustrato, para el control de cenicilla polvorienta en plantas de frijol a nivel de Invernadero.

PARTE EXPERIMENTAL

Inoculación del patógeno.

Se sembraron semillas de frijol en charolas con sustrato peat moss para su germinación, ya germinada la planta, se prosiguió al trasplante a una maceta, para un desarrollo óptimo se, Se trasplantaron dos plántulas por maceta, las plántulas se mantuvieron en condiciones de invernadero y se fertilizaron cada tercer día con una solución compuesta de 101 g de nitrato de potasio (KNO₃), 200 g de nitrato de calcio (CaNO₃), 136 g de fosfato mono potásico (KH₂ PO) y 246 g de sulfato de magnesio (MgSO₄.7H O) por cada 100 L de agua. La fertilización se aplicó de forma directa en el riego. Las plantas al obtener 3 hojas verdaderas se inocularon con esporas de *Erysiphe polygoni* a través de un raspado en el haz de la hoja.

Tratamientos

El té de composta se aplicó de manera foliar y a nivel sustrato a manera de aspersión con una dilución al 75% mediante 3 dosis de aplicación (2.5, 5, 7.5 ml/L), descripción que se muestra en la tabla 1, donde los testigos no tienen ningún tipo de aplicación.

Tabla 1. Tratamientos con té de composta en plantas de frijol

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
T1	2.5 ml de té de composta foliar
T2	2.5 ml de té de composta sustrato
T3	5 ml de té de composta foliar
T4	5 ml de té de composta sustrato
T5	7 ml de té de composta foliar
T6	7 ml de té de composta sustrato
T7	Testigo

Evaluación de severidad de cenicilla polvorienta

La evaluación fue determinada cada semana durante 4 semanas mediante una escala de daño como se muestra en la tabla 2, donde se visualiza el nivel de daño.

Tabla 2. Escala del nivel de daño de cenicilla.

NIVEL DE DAÑO	DESCRIPCIÓN
N0	Sin presencia de hojas con síntomas
N1	1 a 2 hojas con síntomas de cenicilla
N2	3-5 hojas con síntomas de cenicilla
N3	Toda la planta con síntomas

Para la evaluación de severidad se determinó mediante la siguiente fórmula.

$$severidad = \frac{\text{Numero de hojas enfermas}}{\text{Total de hojas que presenta la planta}} \times 100$$

RESULTADOS

Evaluación durante las 4 semanas

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Semana 1	11.86	25	5.16	18.06	2.56	4.9	19.06
Semana 2	10.26	22.4	6.43	21.8	3.56	9.83	19.06
Semana 3	9.8	21.26	4.3	20.96	4	9.16	20.16
Semana 4	5.96	21.8	4.3	28.36	4	12.9	46.5

De acuerdo a los valores sobre la evaluación de Cenicilla polvorienta se observa que los tratamientos aplicados de manera foliar tienen mejor control sobre la enfermedad que los aplicados a forma de sustrato. Los resultados hacen notar que la dosis de aplicación más efectiva fue la del tratamiento 5 (7 ml/L) con 4% de severidad durante las últimas sin embargo el tratamiento 1 (2.5 ml/L) presentó una disminución del nivel de severidad en la cronología de la toma de muestra. Estos resultados también se ven reflejados en la figura 1 donde se muestra la dinámica de la enfermedad a través de las cuatro semanas.

Ramírez, 2011 señala que la cenicilla polvorienta es una enfermedad de amplia distribución en las áreas productoras de frijol de ambiente seco, puede ser perjudicial cuando se presenta antes de la floración, Aunque hasta la fecha, en México no se han registrado daños graves en el cultivo del frijol, la cenicilla no deja de producir efectos nocivos.

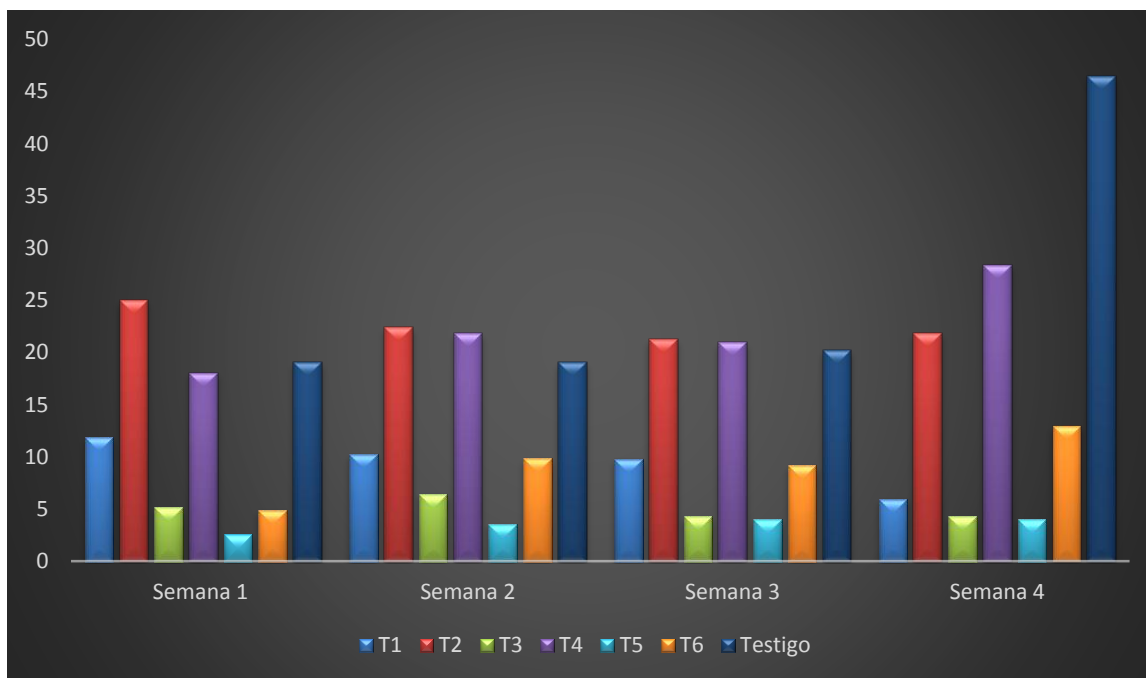


Figura 1. Dinámica de la enfermedad mediante la aplicación de té de composta en plantas inoculadas con cenicilla polvorienta

En base a los resultados se comprueba lo mencionado por Félix, et al; 2008 que al incorporar algún abono orgánico en este caso té de composta ejercerá distintas reacciones en el suelo como son: estimula el desarrollo de plantas (Tan y Nopamombodi, 1979; Hartwigen y Evans, 2000), según los resultados obtenidos en el presente trabajo también se atribuye que ayuda a contrarrestar severidad de cenicilla polvorienta.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados anteriores se deben buscar opciones para el control de enfermedades fitosanitarias y de esa manera disminuir el daño que le estamos provocando a nuestros suelos. para ello hay alternativas como lo señala Ramírez, 2011, el azufre elemental es una opción para el control de cenicilla polvorienta, pero el té de composta es una alternativa más amigable, económica y sustentable tanto para el medio ambiente como para el suelo y el agricultor, ya que provee al suelo de nutrientes como Fósforo, Nitrógeno y Potasio. Evitando con esto el deterioro del medio natural y además es un producto orgánico que controla y ataca a la cenicilla polvorienta y no altera negativamente a los ecosistemas.

Sin embargo, se quiere dejar claro que el té de compost no es una panacea y la solución a todos los problemas, es un complemento al manejo del cultivo y siendo bien utilizado puede generar grandes beneficios económicos y ambientales.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto Politécnico Nacional por la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arancon, N., Edwards, C., Dick, R., & Dick, L. 2016. Soluciones agrícolas y medioambientales.
2. FAO: <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/CucurbitsSpanish.pdf>

3. Félix – Herrán, J.A., Raudel Sañudo, R., Rojo, Martínez, G., Martínez – Ruiz, R. y Olalde – Portugal, V. 2008. Importancia de los abonos orgánicos. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. Universidad Autónoma de México.
4. López C, J. Ferrara y S. 1979. Efecto de la fertilización orgánica sobre la población microbiana en el suelo e Ando de la Sierra Trasca. INIA-CIAB y colegio de Postgraduados, Chapingo. México
5. Petrokov, N. 2016. *Prezi*. Obtenido de Cenicilla Polvorienta: https://prezi.com/f_ecqaumdxzf/cenicilla-polvorienta/
6. Ramírez J, M. 2011 MANEJO QUÍMICO DE LA CENICILLA POLVORIENTA *Erysiphe polygoni* D.C. Ex Merat. EN EL CULTIVO DEL FRIJOL CICLO P-V 2009. San Luis Potosí México.
7. Trinidad S., A. 2011. Abonos Orgánicos. SAGARPA. México.

CAPTURA DE DIÓXIDO DE CARBONO DEL BIOGÁS Y ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS COMERCIAL POR LAS MICROALGAS *Chlorella* sp. Y *Scenedesmus* sp.

Jorge Alejandro Neria Casillas, José Roberto Ramos Ibarra, Francisco Javier Choix Ley

Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara.

RESUMEN

Actualmente el alto contenido de metano del biogás (CO₂, 20-35% y CH₄, 55-75%), generado durante la digestión anaerobia de residuos orgánicos, es considerado una importante fuente de energía alternativa. Sin embargo, es indispensable remover el CO₂ del biogás para utilizarse como fuente de energía. Hoy en día, las microalgas emergen como una estrategia biológica para remover el CO₂ del biogás; no obstante, la selección de la especie de microalga adecuada para remover el CO₂ del biogás es de vital importancia, debido a que la captura y tolerancia de las altas concentraciones de CO₂ es dependiente de cada género y especie de microalga. En este sentido, el presente estudio evaluó la resistencia y remoción de dióxido de carbono del biogás de las microalgas *Chlorella* sp. Y *Scenedesmus* sp. Nuestros resultados demuestran que ambas especies de microalga tienen la capacidad para resistir y remover altas concentraciones de CO₂, así como acumular compuestos de interés biotecnológico como carbohidratos, lípidos y proteínas. Finalmente, este estudio propone el uso de las microalgas de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., para remover el CO₂ del biogás y mejorar la capacidad de bio-refinería de las microalgas.

INTRODUCCIÓN

El biogás crudo se compone principalmente de metano (CH₄: 50-70%, v/v) y dióxido de carbono (CO₂: 25-60%, v/v), así como componentes traza como agua (H₂O), oxígeno (O₂) y sulfuro de hidrógeno (H₂S). El alto contenido de CH₄ del biogás es considerado una valiosa fuente de energía renovable, debido a que puede ser explotado directamente como combustible, o bien como materia prima para la producción de gas de síntesis (syngas) (Meier *et al.*, 2015). Sin embargo, el CO₂ presente en el biogás disminuye el potencial energético del biogás, por lo que su remoción del mismo es indispensable. (Abatzoglou 2009; Yan y Zheng 2013). Al proceso de remover el CO₂ para incrementar la concentración de CH₄ en el biogás se le conoce como “purificación” o “acondicionamiento” del biogás (Méndez *et al.*, 2015).

Hoy en día, existen diversas estrategias físicas y químicas como la absorción química, adsorción fisicoquímica, uso de membranas y criogénica; las cuales son aplicadas para remover el CO₂ del biogás (Méndez *et al.*, 2015). Sin embargo, estas estrategias necesitan grandes cantidades de materiales, reactivos y energía, implicando un alto costo; pero aún más importante, no cuentan con una adecuada disposición final del CO₂, por lo que este compuesto es nuevamente liberado a la atmósfera (Yan y Zheng 2013; 2014). De esta manera, una estrategia biológica y sustentable para remover el CO₂ del biogás es el uso de microalgas. Esto se debe a que estos microorganismos tienen una alta capacidad de remoción de CO₂ mediante su proceso de fotosíntesis, el cual presenta una eficiencia hasta 10 a 50 veces mayor a las plantas terrestres (Bellinger y Sigeo 2010; Ramaraj *et al.*, 2014). Aunque su mayor atributo es la disposición final del CO₂ capturado, el cual es convertido en biomasa y en compuestos celulares de alto contenido energético, como carbohidratos, lípidos y proteínas (Yan y Zheng 2013), los cuales pueden ser posteriormente aprovechados para la obtención de biocombustibles como bioetanol, biodiesel, o metano. Por tal razón, las microalgas son consideradas sistemas de biorefinería (Ullha *et al.*, 2015); convirtiéndolas en un potencial recurso de investigación biotecnológica (Zeng *et al.*, 2015).

Las microalgas son organismos autótrofos unicelulares eucariotas o procariotas, coloniales y filamentosos que habitan diversos ambientes acuáticos en todas las latitudes y ecosistemas del planeta. Son fuentes de biomoléculas y metabolitos de gran importancia económica y constituyen una fuente directa de alimento, medicamentos, forraje, fertilizantes y combustible, e incluso, como indicadoras de contaminación (Liang *et al.*, 2004; Tseng, 2001; Yuan-Kun, 1997).

Las microalgas han adquirido gran importancia en los últimos años ya que presentan la solución a diversos problemas en aspectos de alimentación, producción de biomasa y metabolitos de alto valor agregado de origen natural. Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas revisten gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial (Qiang *et al.*, 2008). Las microalgas

se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular. Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan et al., 1998; Hu et al., 2008).

El proceso utilizado por las microalgas para convertir el CO₂ (carbono inorgánico) en gliceraldehído-3-Fosfato (carbono orgánico) es la fotosíntesis. En la primera fase de la fotosíntesis se llevan a cabo las reacciones dependientes de la luz, las cuales implican etapas fotoquímicas y reacciones de óxido-reducción para sintetizar ATP (adenosin trifosfato) y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Estas moléculas son utilizadas en la segunda fase de la fotosíntesis, donde se llevan a cabo las reacciones no dependientes de la luz o reacciones oscuras. En esta fase la enzima RUBISCO (Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa) mediante el ciclo de Calvin-Benson captura el CO₂ de la atmósfera, posteriormente, utilizando el ATP y NADPH generados en la primera fase de la fotosíntesis, el CO₂ fijado por la microalga es convertido a gliceraldehído-3-Fosfato. Finalmente, dependiendo de las condiciones de cultivo o ambientales en las que se encuentren las microalgas, el gliceraldehído-3-Fosfato formado durante la fotosíntesis, puede ser acumulado como carbohidratos, lípidos o proteínas (Razzak et al., 2013).

TEORÍA

La actividad mundial depende del petróleo, y la escasez de éste ha provocado conflictos sociales y económicos de gran magnitud. Como alternativa energética surgen los biocombustibles para la reducción del consumo de petróleo que de esta manera se contribuya a un desarrollo sustentable. El biogás es el producto de una fermentación anaeróbica de la materia orgánica el cual se ha sometido a un proceso de purificación para elevar la calidad de éste como biocombustible. (Gutiérrez, et al., 2012).

El género *Chlorella* representa un grupo de microalgas verdes eucariotas que tiene un creciente interés científico y comercial. Posee una alta capacidad fotosintética. La *Chlorella* ha sido considerada como una fuente de proteína y ahora se produce industrialmente para alimentos humanos y alimentos para animales. También es rico en petróleo, una materia prima ideal para biocombustibles. Mediante la fotosíntesis la microalga *Chlorella* puede reproducirse en varias horas, requiriendo solo luz solar, dióxido de carbono, agua y una pequeña cantidad de nutrientes. *Chlorella* es fácil de cultivar, tiene un ciclo de vida simple y su ruta metabólica es similar a las de las plantas verdes; por consiguiente se ha utilizado durante mucho tiempo como un organismo modelo para investigar los mecanismos de la fotosíntesis y la asimilación de dióxido de carbono (Ciclo de Calvin-Benson). Debido a su alto contenido proteico y riqueza en carotenoides, vitaminas y minerales, la *Chlorella* también se ha propuesto como un sustituto de los alimentos para los humanos y ahora se produce ampliamente como alimentos saludables en Alemania, China, Japón, y varios otros países asiáticos. Esta microalga se ha considerado como materia prima para la producción de biocombustibles. (Posten, Chen, et al., 2016)

El género *Scenedesmus obliquus* son microalgas verdes unicelulares, presentan flagelos, miden 20 µm de diámetro y generalmente se agrupan de 4 a 8 células dispuestas linealmente o ligeramente en zig-zag (Singh y Singh 2014). Las células de *Scenedesmus obliquus* contienen un único núcleo, que consiste en un cloroplasto en la parte central. Forman colonias en las que se alinean en forma de plato (Hoek, Mann y Jahns, 1995). Esta microalga utiliza como fuente de energía el carbono inorgánico que está presente en el medio acuático en que se encuentre también ha sido ampliamente utilizada en estudios de fotosíntesis y respiración (Richmond 2004), así como en procesos para remover CO₂ del biogás y de emisiones industriales (Ramaraj et al., 2014)

Principalmente las microalgas acumulan lípidos, carbohidratos y proteínas, estos compuestos representan aproximadamente 90% del peso seco de la biomasa algal. Según algunos estudios, el porcentaje de proteínas que tienen las microalgas es de 6-50%; de lípidos 7-60% y de carbohidratos 5-43%, en función de la especie de microalga en estudio. (Chisti, 2007).

A pesar de la capacidad de las microalgas para remover CO₂ del biogás y convertirlo en biomasa microalgal y compuestos de alto valor energético, no todas las microalgas resisten o toleran las altas concentraciones de CO₂ (25-60%) y CH₄ (50-70) del biogás (Sarsekeyeva et al., 2015), debido a que se ha demostrado que dichos compuestos ejercen un efecto inhibitorio durante su crecimiento (Kao et al., 2012). Por tal razón, la selección de la especie adecuada de la microalga para remover el CO₂

del biogás es de vital importancia, debido a que la captura y tolerancia de las concentraciones de CO_2 y CH_4 presentes en el biogás, es dependiente de cada género y especie de microalga (Meier et al., 2015); incluso la misma especie y género de microalga, pero aislada de diferentes regiones geográficas pueden ser fisiológicamente diferentes para remover y tolerar altas concentraciones del CO_2 del biogás (Bellou et al., 2014).

La fotosíntesis es un proceso llevado a cabo por organismos fotoautótrofos, que tienen la capacidad de sintetizar materia orgánica partiendo de la energía del sol y la materia inorgánica. La fotosíntesis que realizan las algas en el medio acuático introducen los nutrientes minerales en la base de las cadenas tróficas de los ecosistemas, generando materia orgánica que es consumida por organismos superiores. Las microalgas emplean la energía de la luz del sol para generar un oxidante lo suficientemente potente como para extraer del agua oxígeno, protones y electrones. Los electrones extraídos del agua reducen, en la fase luminosa de la fotosíntesis, el NADP^+ a NADPH . El NADP^+ es la forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas; el NADPH es su forma reducida, la cual interviene en la fase oscura de la fotosíntesis (ciclo de Calvin) donde se reduce el CO_2 . El NADPH actúa como transportador de energía, la cual se emplea finalmente en sintetizar macromoléculas orgánicas a partir de moléculas precursoras pequeñas. (Martínez, Polo et al., 2011)

La asimilación del dióxido de carbono de las microalgas tiene lugar en tres fases. La primera fase consta de la asimilación del CO_2 en las biomoléculas es la reacción de fijación del carbono: condensación del CO_2 con un aceptor de cinco carbonos, la ribulosa 1,5-bisfosfato, formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. En la segunda fase el 3-fosfoglicerato se reduce a triosas fosfato. En conjunto, se fijan tres moléculas de CO_2 a tres moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato para formar seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (18 carbonos) en equilibrio con la dihidroxiacetona fosfato. En la tercera fase se utilizan cinco de las seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (15 carbonos) en la regeneración de tres moléculas del material inicial ribulosa 1,5-bisfosfato. La sexta molécula de triosa fosfato, el producto neto de la fotosíntesis, puede ser utilizada para formar hexosas que sirven como combustible y como material para producir sacarosa para el transporte a tejidos no fotosintéticos o almidón para almacenamiento. De este modo el proceso es cíclico y permite la conversión continua de CO_2 en triosas y hexosas fosfato. La fructosa 6-fosfato es un intermediario clave en la fase 3 de la asimilación del CO_2 ; es un punto de bifurcación, que dirige hacia la regeneración de ribulosa 1,5-bisfosfato o hacia la síntesis de almidón. En la ruta desde hexosa fosfato a pentosa bisfosfato intervienen muchas de las reacciones utilizadas en células animales para la conversión de pentosas fosfato en hexosas fosfato durante la fase no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato. En la asimilación fotosintética del CO_2 , esta ruta funciona en la dirección opuesta, utilizando básicamente el mismo conjunto de reacciones y convirtiendo hexosas fosfato en pentosas fosfato. (Nelson, Cox et al., 2009)

El uso y las aplicaciones de las microalgas han sido de gran importancia para lo cual han sido cultivadas para diferentes fines. Por otra parte, se han utilizado condiciones naturales favorables para su desarrollo. Las ventajas del cultivo de microalgas se pueden resumir en tres puntos según Cohen (1986):

1. El cultivo de microalgas es un sistema biológico eficiente de utilización de la energía solar para producir materia orgánica. Las microalgas crecen más rápido que las plantas terrestres y es posible obtener mayores rendimientos anuales de biomasa.
2. La composición bioquímica pueden modificarse fácilmente variando las condiciones ambientales y/o la composición del medio de cultivo.
3. Bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular en altas concentraciones compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros. (Luna et al., 2007)

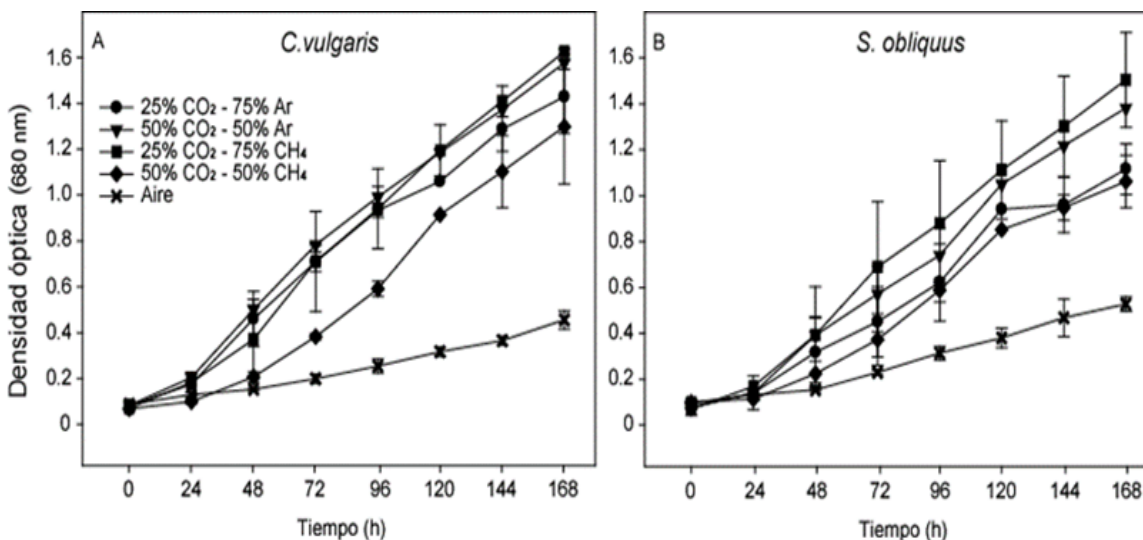
Dado el potencial de las microalgas para remover el CO_2 del biogás y a la diversidad de microalgas presentes en el Lago de Chapala (ubicado en el estado de Jalisco), resulta de gran interés el estudiar el potencial de las especies autóctonas de nuestra región para remover CO_2 del biogás, así como su acumulación de compuestos intracelulares. Hasta el día de hoy, no se ha estudiado el potencial biotecnológico de los géneros y especies de microalgas presentes en el Lago de Chapala. Por tal razón, el presente estudio pretende evaluar el potencial biotecnológico para remover y tolerar altas concentraciones de CO_2 del biogás y acumularlo en metabolitos de interés, como carbohidratos,

lípidos y proteínas en las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., aisladas y purificadas del Lago de Chapala.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Se tomaron 50 mL del cultivo de cada microalga y se inoculó en un matraz de 1 litro conteniendo 450 mL de medio mineral estéril C30 y se mantuvo a una temperatura de $27.5 \pm 2^\circ\text{C}$, con una agitación constante de 110 rpm y una intensidad de luz $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante un periodo de 14 días.
2. La fase experimental se realizó en cinco fases, en cada fase, el cultivo de microalgas fue suministrado con un flujo constante de 3.3 mL/min de una mezcla de gases: 1) 25% CO_2 -75% Argón; 2) 50% CO_2 -50% Argón; 3) 25% CO_2 -75% CH_4 ; 4) 50% CO_2 -50% CH_4 ; 5. Aire.
3. Cada fase se realizó por triplicado y se repitió dos veces.
4. Se determinó el crecimiento de cultivo de las microalgas mediante la técnica de densidad óptica
5. Se determinó el contenido de carbohidratos y proteínas por espectrofotometría y lípidos por gravimetría.

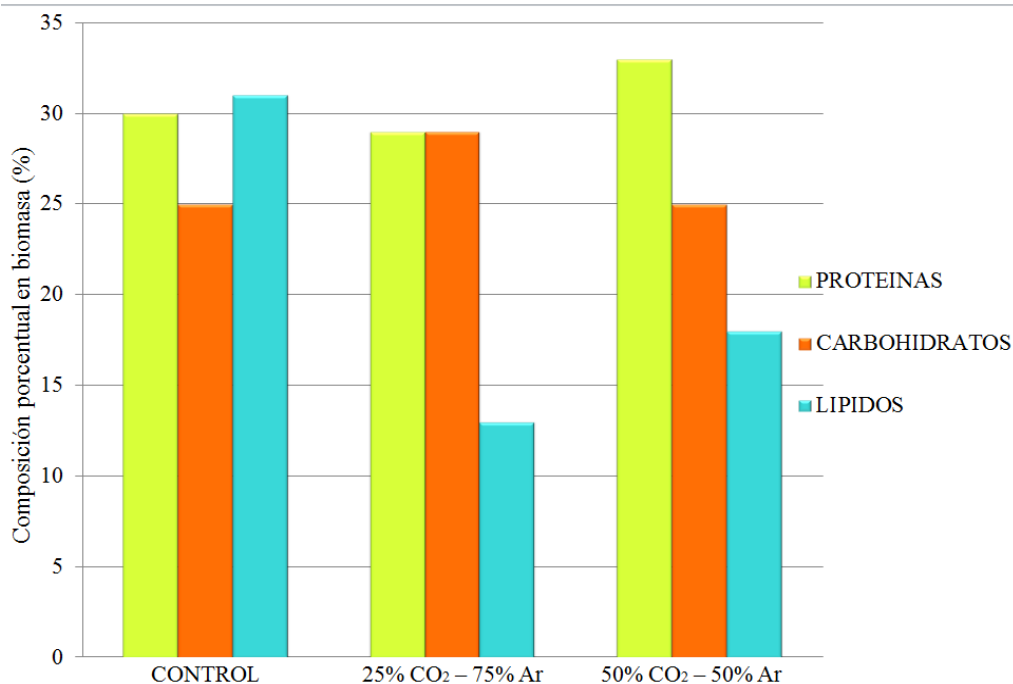
RESULTADOS



La gráfica "A" representa el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en donde se grafica la absorbancia vs el tiempo de incubación. Nos podemos dar cuenta que después de cierto tiempo la microalga presenta un crecimiento favorable con cada una de las fases experimentales (mezcla de biogás), de acuerdo a los resultados obtenidos, la microalga *Chlorella vulgaris* tiene un mayor crecimiento con la fase compuesta con CO_2 25% - 75% CH_4 . Esto nos indica que esta microalga tiene la capacidad de resistir y tolerar altas concentraciones de CO_2 , y al mismo tiempo tiene un crecimiento de manera favorable. Esto se debe a que este género de microalga puede eliminar el CO_2 del biogás mediante el proceso fotosintético que se lleva a cabo y esto conlleva a que se pueda producir un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, actividad bioquímica y eficiencia de captura de CO_2 . En la gráfica "B" se representa al igual que la gráfica "A" el crecimiento exponencial de la microalga del género *Scenedesmus obliquus* en donde se grafica la absorbancia vs el tiempo. En este caso esta microalga presenta un mejor crecimiento con la fase experimental compuesta con CO_2 25% - 75% CH_4 . Esto quiere decir que la microalga *Scenedesmus obliquus* tiene la capacidad de resistir y tolerar altas concentraciones de CO_2 del biogás, y también tiene un crecimiento de manera significativa gracias al proceso fotosintético que esta microalga produce.

Estos resultados se obtuvieron de acuerdo a una metodología establecida con las condiciones necesarias para que se pudiera llevar a cabo el análisis del presente estudio, que es evaluar la capacidad biotecnológica de las microalgas autóctonas del Lago de Chapala- Jalisco para capturar

y resistir altas concentraciones de CO₂ del biogás y la acumulación de compuestos de interés comercial.



En esta gráfica se representa la composición porcentual de biomasa de compuestos intracelulares como carbohidratos, lípidos y proteínas en cada una de las fases (mezcla de biogás). Las barras que representan la fase de control indican que hay una acumulación compuesta por un 30% de proteína, 25% de carbohidratos y un 31% de lípidos; en cambio en las fases compuestas por 25%CO₂-75%Ar y 50%CO₂-50%Ar existe una acumulación diferente de estos compuestos intracelulares, esto se debe a que las microalgas pueden sintetizar estos compuestos y con las diferentes mezclas de biogás se obtienen diferentes porcentajes de carbohidratos, lípidos y proteínas.

CONCLUSIONES

Este estudio demostró el potencial biotecnológico para resistir y remover altas concentraciones de CO₂ del biogás en las microalgas *Chlorella* sp. Y *Scenedesmus* sp. aisladas del lago de Chapala, por lo que son consideradas como excelentes candidatos para utilizarse en procesos biotecnológicos para la obtención de biocombustibles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Meier L, Pérez R, Azócar L, Rivas M, Jeison D. 2015. Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. *Biomass and bioenergy*. 73:102-109.
2. Abatzoglou N. 2009. A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 3:42-71.
3. Yan C, Zheng Z. 2013. Performance of photoperiod and light intensity on biogas upgrade and biogas effluent nutrient reduction by the microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*. 139:292-299.
4. Méndez L, Mahdy A, Ballesteros M, González-Fernández C. 2015. *Chlorella vulgaris* vs cyanobacterial biomasses: Comparison in terms of biomass productivity and biogas yield. *Energy Conversion and Management*. 92:137-142.
5. Yan C, Zheng Z. 2014. Performance of mixed LED light wavelengths on biogas upgrade and biogas fluid removal by microalga *Chlorella* sp. *Applied Energy*. 113:1008-1014.

6. Bellinger EG, Sigeo DC. 2010. Freshwater algae: identification and use as bioindicators. West Sussex: Wiley-Blackwell. p. 1.
7. Ullha K, Ahmad M, Sofia-Sharma VK, Lu P, Harvey P, Zafar M, Sultana S. 2015. Assessing the potential of algae biomass opportunities for bioenergy industry: A review. *Fuel*. 143:414-423.
8. Zeng X, Guo X, Su G, Danquah MK, Zhang S, Lu Y, Sun Y, Lin L. 2015. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 42:1385-1392.
9. Liang, S., Liu, X., Chen, F., & Chen, Z. (2004). Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiologia*, 512, 45-48.
10. Tseng, C. (2001). Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology*, 13, 375-380.
11. Yuan-Kun, L. (1997). Commercial production of microalgae in the Asia Pacific rim. *Journal of Applied Phycology*, 9, 403-411.
12. Qiang, H., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. USA.
13. Arredondo BO & Vázquez-Duhalt R (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111.
14. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, & Roessler P (1998) A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p.
15. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M & Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*. 54: 621-639.
16. Razzak SA, Hossain MM, Lucky RA, Bassi AS, De Lasa H. 2013. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing, a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 27:622-653.
17. Guadalupe de Jesús Gutiérrez García. (Julio 2012). Biogás: una alternativa ecológica para la producción de energía. octubre 2017, de Concyteg Sitio web: http://www.concyteg.gob.mx/ideasConcyteg/Archivos/85_1_GUTIERREZ_GARCIA_ET_AL.pdf.
18. Clemens Posten Steven Feng Chen. (2016). *Microalgae Biotechnology*. Switzerland: Springer.
19. Sarsekeyeva F, Zayadan BK, Ussebaeva A, Bedbenov VS, Sinetova MA, Los DA. 2015. Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. *Photosynthesis research*.
20. Kao CY, Chiu SY, Huang TT, Dai L, Wang GH, Tseng CP, Chen CH, Lin CS. 2012. A mutant strain of microalga *Chlorella* sp. for the carbon dioxide capture from biogas. *Biomass and bioenergy*. 36:132-140.
21. Bellou S, Baeshenb MN, Elazzazy AM, Aggeli D, Sayegh F, Aggelis G. 2014. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*. 32(8):1476-1493.
22. Ana Ruiz Martínez, José Ferrer Polo. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. . 2017, de Universidad Politécnica de Valencia Sitio web: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>
23. David L. Nelson, Michael M. Cox. (2009). *Lehninger principios de bioquímica*. Spain: Omega.
24. Liliana M. Gómez Luna. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, XIX, 19.
25. Richmon A. 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Iowa: Blackwell Science. cap. 1
26. Ramaraj R, Tsai DDW, Chen PH. 2014. Freshwater microalgae niche of air carbon dioxide mitigation. *Ecological Engineering*. 68:47-52.
27. Singh S, Singh P. 2014. Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 172-179.

28. Raúl Ernesto Olivares. (Enero de 2010). Producción de aceite para usos industriales a partir de la microalga "Scenedesmus Obliquus". Noviembre de 2017, de Universidad de el Salvador, Facultad de Ingeniería y arquitectura Sitio web:http://ri.ues.edu.sv/2162/1/Producci%C3%B3n_de_aceite_para_usos_industriales_a_partir_de_la_microalga_%E2%80%9CScenedesmus_Obliquus%E2%80%9D.pdf (Hoek, Mann y Jahns, 1995).
29. Chisty Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25:294-306.

CARACTERÍSTICAS PERINATOLÓGICAS DE LA CAPACIDAD TERMORREGULADORA EN GANADO HOLSTEIN NEONATO

Sonia Vázquez-Flores, Verónica Rocío Sánchez Pérez, Laura Enríquez Quijada

Tecnológico de Monterrey-Querétaro svazquef@itesm.mx, iaverosan@gmail.com,
lau1228@hotmail.com

RESUMEN

La atención perinatólogica del recién nacido es un área deficiente en explotaciones lecheras en general. Se estima que del 30 al 50% de los becerros al parto requieren ayuda (House, 2015). El 75% de las muertes ocurren durante la primera hora de vida, estimándose que el 90% son previsibles. El impacto de una muerte neonatal es: económica (400-600 USD) (De Vries, 2006), genética, y de la siguiente generación, además de daño ginecológico en la madre (Mee, 2008). Se realizó un estudio observacional en el bajío mexicano, en una explotación lechera de Holstein-Friesian. El objetivo fue monitorear el sistema de termorregulación del recién nacido. El grupo cohorte fue de 43 becerros (17 machos y 26 hembras), los cuales recibieron atención durante el parto hasta la primera hora de vida. Se monitoreó la temperatura toraco-abdominal exterior, auricular y ambiental con una cámara termográfica de rayos infrarrojos, y rectal con termómetro digital. Los resultados del análisis mostraron que los machos presentan una mayor pérdida de temperatura, en relación directa con mayor peso al nacimiento. Las menores pérdidas de calor fueron cuando el becerro fue estimulado por 15 minutos mediante el secado de pelaje por su madre. Inmediatamente después del parto, se identificó una caída de temperatura rectal de 0.6°C en promedio y externa de 3°C, a los 15 minutos la temperatura aumentó, siendo estadísticamente diferente al T⁰ y <30 minutos después (Valor p <0.0001). Esta pérdida de temperatura corporal indicó que, pese a temperaturas ambientales de 34°C, existe la necesidad de estimular la circulación del becerro, proveerle una fuente de calor y abrigo, y alimentarlo prontamente con calostro para incrementar su energía y evitar hipotermia.

INTRODUCCIÓN

El cuidado neonatal en bovinos de leche es un área que demuestra deficiencias en la mayoría de las producciones pecuarias de forma global. El impacto en la supervivencia durante el peri-parto presenta pérdidas económicas por distocia, parto prematuro y muerte neonatal (Kasari *et al.* 1994). El costo para el productor es diferente dependiendo de la naturaleza de la pérdida. En caso de que muera la vaca o tenga daño ginecológico severo, el gasto aproximado es de \$37,000 MN, mientras que si ocurre una pérdida de gestación el gasto es de \$11,000 MN. Si se pierde un becerro sin poco valor genómico al nacimiento, el gasto es de \$7,600 MN, y con alto valor genómico \$11,500 MN o más dependiendo de su origen (De Vries, 2006). Se considera que la muerte perinatal es durante las primeras 24 horas de vida, con un periodo gestacional superior a 260 días, esta condición no considera la muerte por complicaciones al parto. El 75% de las muertes ocurren durante la primera hora de vida, estimándose que el 90% son previsibles (Mee *et al.*, 2008). Existen diferentes factores de riesgo que influyen en la mortalidad perinatal, no sólo relacionados con problemas de distocia, por lo que se está en constante estudio de los factores de riesgo (McGuirk, 2007).

TEORÍA

Termorregulación en neonatos

Los factores que afectan la muerte perinatal pueden estar asociadas al proceso parto, edad al primer parto, partos gemelares, duración de la gestación, condición corporal de la madre, tamaño de la cría, deficiencia en los nutrientes de la dieta y genética del semental. Adicionalmente pueden influir los factores externos a la madre y al becerro como el manejo al momento del parto y la condición climatológica. La combinación del clima, con las múltiples rutas de termólisis y la predisposición del neonato es lo que convierte a la condición climatológica en un factor de riesgo (Carstens, 1994).

Dentro del útero el feto se encuentra a una temperatura aproximada de 38.8° C, al momento que nace el neonato, esta temperatura puede caer abruptamente hasta los 20°C. Esta disminución en la temperatura corporal provoca la pérdida de homeotermia del neonato, dado que la temperatura unos minutos antes era controlada por la madre en el ambiente intrauterino. El proceso de parto genera

un deficiente estado fisiológico, aunado a la hipoxia propia de un recién nacido, lo que complica el proceso de termorregulación (Vermorel *et. al.* 1983). Es por eso que el neonato para poder mantener un balance térmico y evitar caer en hipotermia o incluso la muerte, debe adaptarse rápidamente al ambiente extrauterino. Esta homeotermia la genera por escalofríos o sin escalofríos, el ambiente que se le provee, y la atención del humano y la madre post-parto (Carstens, 1994).

Los becerros presentan dos formas de termorregulación: la primera es la termogénesis a través de escalofríos, el cual consiste en que todo el sistema músculo-esquelético presenta contracciones suaves y frecuentes, activándose por medio del sistema nervioso central para generar calor. La termogénesis sin temblores, involucra el tejido adiposo pardo del recién nacido. La grasa corporal ayuda al becerro a generar energía endógena, la cantidad de tejido adiposo pardo en un recién nacido es del 2% (Alexander *et al.*, 1975). También presentan tejido blanco cuya principal función es almacenar y asegurar que los ácidos grasos estén disponibles para ser usados como energía. La temperatura se genera vía glicólisis anaerobia a partir de la oxidación de ácidos grasos en las crestas mitocondriales estimuladas por una proteína termogénica activada por la noradrenalina (Asakura, 2004). Es preciso mencionar que ésta capacidad regulatoria depende de la nutrición que tuvo la madre y qué tan rápido ingiera calostro el becerro después del parto (Carstens, 1994).

La normotermia se mantiene por una elevación de la frecuencia respiratoria, particularmente en ambientes fríos, un aumento en la circulación sanguínea, por flujos hormonales, o porque la madre lo lame vigorosamente para secarlo. Otras fuentes de energía son: lactato, cetoácidos, aminoácidos y glucógeno. La glucosa circulante del recién nacido es del 70 al 80% de origen materno bajando a considerablemente en la primera hora de vida (32 Kcal/Kg/día). Al nacimiento, el becerro presenta de 50 a 60 g/dL de glucosa sanguínea llegando a 100 mg/dL a las 24 horas de vida. La energía metabólica se obtiene a partir del glucógeno acumulado en el hígado, corazón y músculo-esquelético (Kasari, 1994). El glucógeno hepático se utiliza en las primeras 3 a 4 horas de vida. La termogénesis requiere de oxigenación, por lo que, durante un prolongado periodo de hipoxia, la termorregulación es menos eficiente, puesto que la oxigenación entonces proviene del metabolismo celular. Una pobre oxigenación, incrementa la posibilidad de que el equilibrio ácido-básico sea deficiente. Una condición de acidosis, implica una gran cantidad de iones de hidrógeno en los tejidos. El pH venoso es de 7.2 a 7.3 en un recién nacido, y en caso problemas al parto de 7.0, estabilizándose a 7.4 a las 12 horas de vida (Grove-White, 2000).

En 1994, Azzam y cols., correlacionaron las condiciones climatológicas con la tasa de mortalidad en becerros *Bos taurus*, la tasa aumentó conforme la temperatura ambiental descendía, o había precipitación pluvial durante el parto. El estrés de los becerros al buscar mantener su homeotermia provocó que las muertes incrementaran, presentando además debilidad severa y una absorción tardía de inmunoglobulinas (Azzam *et al.*, 1994).

Otro indicador relacionado con el balance térmico es la temperatura rectal; la cual puede ser usada para evaluar la adversidad del medio ambiente calórico sobre el crecimiento, lactación y reproducción en el ganado lechero (Johanson, 1987; Hahn, 1994). En recién nacidos, la temperatura es aproximadamente de 39.5° C. Sin embargo, durante la primera hora de vida desciende, estabilizándose en las primeras cinco horas de vida dependiendo de las condiciones climatológicas se establece en 38.8°C. En condiciones ambientales frías (menores a 14°C), puede tardar hasta dos días en tener una temperatura rectal homogénea (Vermorel *et. al.* 1983).

Los bovinos, al ser animales homeotermos, son menos susceptibles a los cambios de temperatura. La zona de confort termoneutral en becerras menores a tres semanas es de 15 a 21°C (NRC, 2001). Se han estudiado dos rutas de pérdida de calor en los recién nacidos. Una de ellas es la evaporativa, por el líquido amniótico del pelaje que se evapora y el calor que se disipa desde las vías respiratorias, que al ser una actividad endotérmica le resta calor al becerro. La segunda ruta es la no evaporativa; ésta se lleva a cabo por medio de la transferencia de calor por conducción, es decir, el calor que pasa a través de la piel, lo que involucra el área en donde se encuentra, el tipo de cama y el ambiente (Cook *et al.* 2004). Ambas rutas de pérdida de calor involucran el uso de calorías, provocando así que el animal utilice las reservas con las que nace y con la consecuente hipotermia. El calostro, además de la inmunidad pasiva, constituye entonces una fuente de energía que permite controlar la pérdida de calor (Cook *et al.* 2004). Una temperatura ambiental menor a 14°C y que la cría no esté suficientemente seca, aumenta la movilización de las reservas energéticas. El becerro recién nacido presenta acidemia por la producción de lactato-L, como consecuencia de la saturación de CO₂ que

se mantiene por 4 horas en niveles elevados. La acidosis inicialmente respiratoria y se hace metabólica, cuando el lactato-L circulante no es metabolizado rápidamente por el riñón (Bleul y Gotz, 2013; Romano y Vázquez-Flores, 2018)). Una hipoxia prolongada, aunada con acidosis respiratoria y metabólica, genera somnolencia, el becerro se postra, disminuyéndose las probabilidades de sobrevivencia y reduciendo la absorción de inmunoglobulinas (Besser y Gay, 1994).

Etapas del parto

El parto en bovinos se divide en tres etapas. La primera es la preparación de la vaca/vaquilla de primer parto donde el becerro se acomoda gradualmente en el canal de parto. La hembra al parto experimenta contracciones musculares, que se hacen cada vez más frecuentes, con la expulsión del tapón mucoso, la relajación de los ligamentos pélvicos y la relajación del cérvix. La hembra al parto, se manifiesta inquieta, puede presentar pérdida de apetito, y voltea la cabeza constantemente hacia el vientre cuando hay una contracción.

La segunda etapa está relacionada con la expulsión de la cría, el saco amniótico sale de la vagina, se observan los miembros anteriores o posteriores protruyendo. Las contracciones se hacen más intensas y en tiempos más cercanos. Esta etapa dura aproximadamente 2 horas en la vaca y 4 horas en la vaquilla de primer parto. Una vez que el cérvix está completamente dilatado, la cría es expulsada en 22 minutos. Actualmente, con la condición genética de producir una cría chica al parto, por medio de toros que tienen la característica de facilidad de parto, los tiempos se han disminuido considerablemente de 20 a 40 minutos.

La tercera etapa es la eliminación de la placenta en las primeras 8 a 12 horas postparto (Stuttgen, 2011).

Parto y sus complicaciones

La dificultad al parto se conoce como distocia, y es el resultado de un prolongado proceso de expulsión de la cría o una alteración en la extracción por manipulación humana (Mee, 2004). En el caso de bovinos, se denomina distocia cuando la etapa de expulsión supera las 4 horas durante la fase dos. Existen diversos factores propios del becerro como el peso, duración de la gestación, sexo, raza, nutrición y clima. Y los propios de la madre como el tamaño de la pelvis, peso corporal al servicio efectivo, edad de la hembra y condición corporal al parto (Mee, 2011).

Existe un factor fisiológico al cual se le asocia el 10% de las distocias en ganado lechero, que es un proceso denominado inercia uterina. Cuando el cérvix está completamente dilatado, y las contracciones miométricas son muy débiles para expulsar al feto, por ejemplo, en primíparas excedidas en condición corporal, limitada disponibilidad del magnesio y calcio conduce a la inercia uterina, la cual prolonga la segunda etapa parto. Este padecimiento puede ser primario, como consecuencia de hipocalcemia, o secundaria en el caso de parto gemelar (Mee, 2008).

En primíparas es común que la vulva no se dilate completamente, mientras que en pluríparas, el problema es la dilatación incompleta del cérvix, ambos casos están relacionados con estrés ambiental en el periparto y asistencia prematura (Mee, 2007). El control individual en vacas próximas al parto, es relevante para detectar problemas y generar las medidas preventivas pertinentes. Una atención a tiempo, permite disminuir el estrés por el deficiente manejo, particularmente en aquellas hembras con historial de distocias (Miedema *et. al.* 2011). Una mala posición de extremidades o del cráneo representa un 20 a 40% de los casos distocia, siendo la causa más común. Aunque hay solo 5% de prevalencia los becerros que vienen mal posicionados tienen 5 veces más oportunidad relativa de morir al nacer y 3 veces más posibilidad de favorecer distocia. Esta condición puede estar influenciada por el semental, que la cría sea macho, y partos gemelares (Mee, 2013).

Las principales secuelas financieras de la distocia son: el 41% del costo de la producción, 34% en fertilidad y 25% de mortalidad en la vaca o becerro, esto sin incluir gastos del desecho por daño ginecológico, además de cuidados médicos, tratamientos y que no es un candidato a producir leche durante el periodo fresco. La distocia produce desórdenes en los sistemas respiratorio y digestivo en la madre y su cría, retención de placenta, inflamación e infección uterina, mastitis e hipocalcemia. Una vez que la vaca presenta un parto complejo es más propensa a que se presente en los partos siguientes (Mee, 2008).

La asistencia al parto se define como una intervención durante dicho proceso, esto sin llegar a ser distocia. Se puede clasificar en tres: sin asistencia, poca asistencia y asistencia, todas relacionadas a la manipulación de la cría, la intensidad y tiempo de expulsión (Colburn *et. al.* 1997)

Uso de la metodología termográfica

La toma de temperatura se realizó con una cámara termográfica marca FLIR, para identificar la emisión y absorción de calor. Esto se analiza mediante un software que identifica la temperatura de las imágenes capturadas por el microbolómetro que traduce el calor en un impulso eléctrico y una imagen termográfica por efecto del uso de rayos infrarrojos en tiempo real. La pérdida de calor no evaporativa involucra el flujo de calor generado por el metabolismo, el organismo mantiene la homeostasis por efecto de la radiación, convección y conducción. Entendiendo la radiación como el balance neto entre la ganancia de calor por radiación solar y la pérdida de calor por contacto de la piel con la superficie del piso. La transferencia de calor por conducción es el intercambio de calor desde el pelaje hacia el ambiente. La pérdida de calor por convección, se refiere al paso del aire sobre el pelaje que cuando está húmedo permite el enfriamiento de la superficie por el intercambio de temperatura entre el aire y pelaje (Kasari, 1994). Es por esto que se realizaron tomas de temperatura por medio de la cámara termográfica, además de la temperatura rectal que evalúa la respuesta interna al ambiente (Vázquez-Flores y Lucio-Rodríguez, 2017).

Justificación del estudio

El estudio fue observacional y prospectivo, realizado en una producción lechera en San Miguel Allende, Guanajuato. En esta explotación durante los meses de junio y julio se presentaron 68 muertes neonatales, además de altos porcentaje de vacas con enfermedades reproductivas y metabólicas como consecuencia de una mala atención al parto. Todas las primíparas requirieron algún nivel de asistencia al parto. Las crías recién nacidas presentaron desde hipoxia, deficiente vitalidad e incremento de la mortalidad. Las vacas con distocia presentaron retención de placenta, desgarres de vulva, metritis infecciosa, y en algunos casos mortalidad. Para identificar los factores de riesgo en la explotación se inició este estudio puesto que estaba afectando la producción y eficiencia postparto.

Objetivo general

Identificar los factores de riesgo que afectan la termorregulación del neonato en la primera hora de vida, monitoreando temperatura interna y externa cada 15 minutos.

Objetivos secundarios

Se analizaron factores de riesgo como: tipo de parto, nivel de ayuda al parto, determinación de características de termorregulación por género, tipo de secado del becerro en la primera hora postparto (por la vaca o por el humano).

PARTE EXPERIMENTAL

Sitio de estudio

El estudio observacional prospectivo se realizó en un Establo de Holstein-Friesian ubicado en San Miguel de Allende, Guanajuato. Durante todo el año la temperatura presenta variaciones entre 8°C y 28°C, lo que representa que durante las madrugadas están fuera de la zona de confort térmico, con una diferencia de 20°C durante el día (Martin et al. 1975). El número recién nacidos durante el periodo de estudio fue de 202 neonatos atendidos al parto, a los cuales se observó desde que la vaca estaba en fase 2 del parto.

Manejo de la cría al parto y monitoreo termográfico

Al iniciar segunda etapa del parto inició la toma de temperaturas. Dos personas colaboraban en el proceso. Primero se identificó la temperatura ambiental con la cámara termográfica. Al momento de la expulsión del becerro se determinó el tipo de asistencia requerida por el recién nacido. Una vez que la cría era totalmente expulsada se procedía al retiro manual del moco y restos de placenta de las vías aéreas. Posteriormente se hacía un estímulo para la respiración mediante la aplicación de agua fría en la oreja (Nagy, 2009). Se indujo la respiración estimulando el espacio medio inferior de la nariz con una aguja en el punto GV26 (Renzhong) (Rogers, 1999). Además de estimular la circulación por medio de masajes en la zona torácica, cerca del corazón en dirección craneal. Simultáneo a la atención al parto, otra persona capturaba las imágenes termográficas a 60 cm del sujeto de estudio tomando una imagen del área del toraco-abdominal, seguida de la toma de temperatura rectal con termómetro digital. Al haber transcurrido un máximo de 15 minutos con la madre, al becerro era retirado del área de parto y se transportado al cunero.

Caracterización de la ayuda durante el parto

Para poder establecer nuestros parámetros de resultados se clasificaron los tipos de partos en:

1. Sin Ayuda (S/A)
2. Poca Ayuda (P/A)
3. Ayuda (A)
4. Distocia (D)

Manejo de la cría en periodo post-parto

Se realizó el secado manual a la cría dentro del área del cunero. Se le hizo el proceso de asepsia umbilical por medio de inmersión con yodo al 7%. Si el becerro requería se le aplicaba un desinflamatorio para estimular el proceso respiratorio y disminuir la acidosis. Durante la primera hora de vida se le administraron 2 L de calostro a una temperatura de 37.5° con biberón. Se repitió la toma de temperatura externa e interna cada 15 minutos durante la primera hora de vida, bajo las condiciones explicadas anteriormente.

Análisis termográfico con freeware software

Para analizar las imágenes termográficas obtenidas, se utilizó el software freeware FLIR tools, versión 2.1 (2014). Se analizó el área toraco-ventral con una toma circular del área, lo que permite obtener la temperatura media del máximo y mínimo de temperatura del área, con un punto de emisividad de 0.98 (Hovinen et al. 2008).

Análisis estadístico

Se generó una base de datos, registrando las temperaturas internas, externas, comparación de temperaturas interna y externa, tipo de parto, nivel de ayuda al becerro, género relacionado con temperaturas y tipo de parto. El análisis estadístico se realizó con el software JMP 13.1.0, número de serie QVNJ0B0JJ7. Las pruebas realizadas fueron análisis demográficos, medias y desviaciones estándar, pruebas paramétricas de T-de Student y Hsu's MCB, y regresión lineal.

RESULTADOS

Con base en el estudio de observación, se obtuvo una muestra de 42 becerros al parto, siendo 16 machos y 26 hembras en donde se muestran las temperaturas medias y desviación estándar de las temperaturas internas, externas y sus diferencias (Tabla 1). En el caso de la temperatura interna y externa, por grupo se comportaron de forma muy similar. Inmediatamente después del parto, se identificó una caída de temperatura rectal de 0.6°C en promedio y externa de 3°C, a los 15 minutos la temperatura aumentó, siendo estadísticamente diferente al T⁰ y <30 minutos después (Valor p <0.0001).



Imagen 1. Atención al parto con monitoreo termográfico

Tabla 1. Temperatura media y desviación estándar por género

Género	Temperatura interna (TI)	Temperatura externa (TE)	Diferencia entre TI y TE
Hembras (26)	38.5 ± 0.8 °C	27.8 ± 4.9 °C	11.09 ± 5.7 °C
Machos (16)	38.3 ± 0.8 °C	27.8 ± 4.8 °C	10.5 ± 4.6 °C

En cuanto al tipo de parto, las crías hembras sólo presentaron partos sin asistencia o con ayuda, mientras que los machos presentaron 1 caso con poca ayuda al recién nacido de vaca y 2 casos de distocia nacidos de vaquillas de primer parto (Tabla 2). No hubo diferencias estadísticas los casos de nacimiento por género, ni por origen. Si de nacimientos por vaquillas en comparación con vacas en el análisis de regresión logística nominal (Valor $p = 0.0096$).

Tipo 2. Tipo de parto de acuerdo al género de la cría al nacimiento

Tipo de Parto	Vaca		Vaquilla	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Sin ayuda	7	10	13	3
Poca ayuda	0	1	0	0
Ayuda	1	1	5	0
Distocia	0	0	0	2
No. de partos	8	12	18	5

En cuanto a la temperatura de las crías nacidas con ayuda, se observó una diferencia significativa con el resto de los tipos de parto en cuanto a temperatura interna. Para el caso de temperatura de emisión (temperatura externa), se observó que los becerros nacidos de distocia emitían menos temperatura, y que los que emitían más fueron los animales que recibieron poca ayuda (Tabla 3).

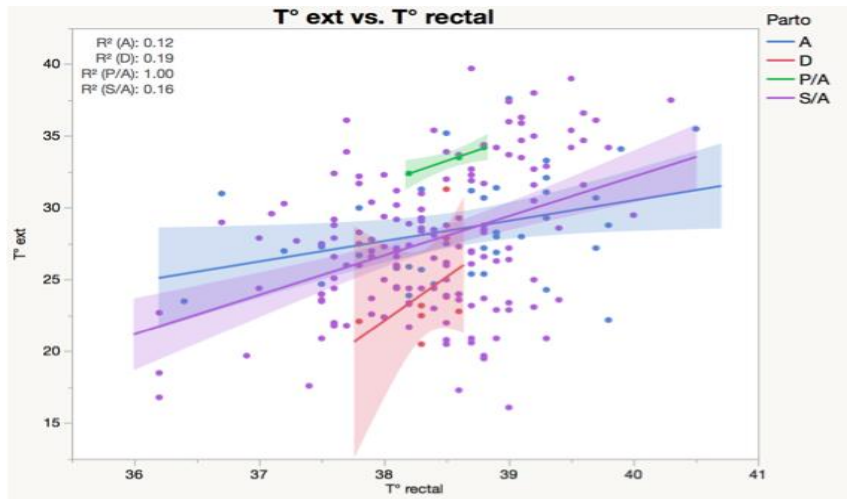
Tabla 3. Temperatura interna, de emisión y diferencia de temperaturas de acuerdo al tipo de parto.

Tipo de Parto	Temperatura interna °C (TI)	Temperatura de emisión °C (TE)	Diferencia entre TI y TE
Distocia (D)	38.4 ± 0.3 ^{a,b}	24.2 ± 3.5 ^c	14.1 ± 3.4 ^{a,b}
Ayuda (A)	38.7 ± 0.9 ^a	28.7 ± 3.7 ^{a,b}	10 ± 3.5 ^b
Poca Ayuda (P/A)	38.5 ± 0.3 ^{a,b}	33.4 ± 0.3 ^a	5.2 ± 0.6 ^b
Sin Asistencia (S/A)	38.4 ± 0.8 ^{a,b}	27.7 ± 5.02 ^b	11.01 ± 5.6 ^a

Los valores no conectados por la misma letra son significativamente diferentes (Valor $p < 0.05$), el análisis comparativo es por columnas.

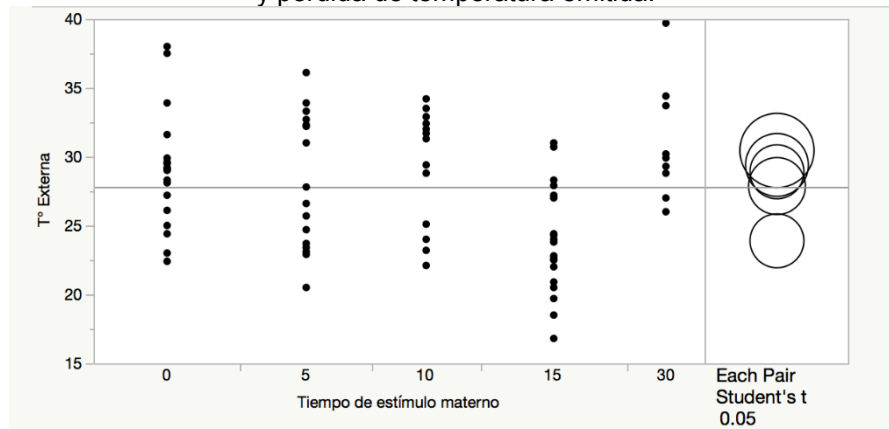
En el análisis de regresión lineal comparando temperatura interna comparando la temperatura emitida, las crías con poca asistencia tuvieron una perfecta correlación.

Gráfica 2. Relación entre tipo de parto y temperaturas interna y emitida por las crías en la primera hora de vida.



En cuanto al tiempo de estimulación, no hubo diferencias en temperatura interna de hembras y machos por el tiempo que los secó su mamá. Se mostraron diferencias significativas en la pérdida de calor por la cantidad de temperatura emitida $23.9 \pm 4.1^\circ\text{C}$ analizando con T de Student, cuando a los machos los secó su mamá por 15 minutos, donde perdieron menos temperatura en general, no hubo diferencias en las hembras (Gráfica 3).

Gráfica 3. Tiempo de estimulación materna para el secado del becerro y pérdida de temperatura emitida.



La temperatura corporal en becerros menores de 33 Kg parece ser menor que en animales de mayor peso, no hay diferencias estadísticas porque no hay suficientes. La emisión de temperatura en machos de 40 Kg fue estadísticamente menor que en el resto del grupo (Valor $p = 0.05$), cuando se realizó la prueba T de Student.

CONCLUSIONES

Existe una fuerte correlación entre la regulación térmica de la cría durante la primera hora de vida y el tipo de parto, donde la distocia si presenta influencia marcada sobre la termorregulación de los becerros.

Se identifica que la ayuda ligera al becerro al momento del parto favorece una termorregulación eficiente.

Existe una correlación entre la asistencia de la madre al becerro por 15 minutos y una menor temperatura emitida

Se identificaron diferencias de eficiencia en la termorregulación entre machos de peso cercano a los 40 Kg en comparación con las hembras.

Esta pérdida de temperatura corporal indicó que, pese a temperaturas ambientales de 34°C, existe la necesidad de estimular la circulación del becerro, proveerle una fuente de calor y abrigo, y alimentarlo prontamente con calostro para incrementar su energía y evitar hipotermia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander, G., Bennett, J. W., Gemmell, R. T. (1975). Brown adipose tissue in the new-born calf (*Bos taurus*). *The Journal of Physiology*, 244(1), 223-234.
2. Asakura, H. (2004). Fetal and neonatal thermoregulation. *Journal of Nippon Medical School*, 71(6), 360-370.
3. Atrian, P., & Shahryar, H. A. (2012). Heat stress in dairy cows (a review). *Research in Zoology*, 2(4), 31-37.
4. Barrier, A., Mason, C., Dwyer, C., Haskell, M. & Macrae, A. (2013). Stillbirth in dairy calves is influenced independently by dystocia and body shape. *The Veterinary Journal* 197(2): 220-223.
5. Barrier, A. C., Ruelle, E., Haskell, M. J., & Dwyer, C. M. (2012). Effect of a difficult calving on the vigour of the calf, the onset of maternal behaviour, and some behavioural indicators of pain in the dam. *Preventive Veterinary Medicine*, 103(4), 248-256.
6. Beam, A. L., Lombard, J. E., Koprak, C. A., Garber, L. P., Winter, A. L., Hicks, J. A., Schlater, J. L. (2009). Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* 92(8): 3973-3980.
7. Bellomo, R. (2002). Bench-to-bedside review: lactate and the kidney. *Critical Care*, 6(4), 322.
8. Berglund, B., Steinbock, L., Elvander, M. (2003). Causes of Stillbirth and Time of Death in Swedish Holstein Calves Examined Post Mortem. *Acta Veterinaria Scandinavica* 44(3): 111-120.
9. Besser, T. E., & Gay, C. C. (1994). The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(1), 107-117.
10. Bleul, U., & Götz, E. (2013). The effect of lactic acidosis on the generation and compensation of mixed respiratory-metabolic acidosis in neonatal calves. *The Veterinary Record*, 172(20), 528-528.
11. Carstens, G. E. (1994). Cold thermoregulation in the newborn calf. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(1), 69-106.
12. Colburn, D. J., Deutscher, G. H., Nielsen, M. K., and Adams, D. C. (1997). Effects of sire, dam traits, calf traits, and environment on dystocia and subsequent reproduction of two-year-old heifers. *Journal of Animal Science*, 75(6), 1452-1460.
13. Cook N. B., Nordlund KV (2004). "Veterinary Clinics of North America: food animal practice. Managing the transition cow to optimize health and productivity" Elsevier Saunders editors.
14. Collier, R. J., G. E. Dahl, and M. J. VanBaale. 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:1244–1253. Dahl, G., Tao S, Monteiro A. (2016). Effects of late-gestation heat stress on immunity and performance of calves, *Journal of Dairy Science*, Vol. 99 No. 4.
15. FLIR tools, versión 2.1 (2014) <http://www.flir.com.mx/instruments/display/?id=54865>
16. Grove-White, D. (2000). Resuscitation of the newborn calf. *In Practice*, 22(1), 17-23.
17. Johanson, J. M. Berger., P. J. (2003). Birth Weight as a Predictor of Calving Ease and Perinatal Mortality in Holstein Cattle. *Journal of Dairy Science* 86(11): 3745-3755.
18. Kasari, Thomas R., and Steven E. Wikse. (1994). "Perinatal mortality in beef herds." *Food animal practice*.
19. Kadzere, C. Murphy M, Silanikove N, Maltz E., (2011). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77: 59–91 Mee, J. F. (2008). Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: A review. *The Veterinary Journal*, 176(1), 93-101.

20. Hovinen, M., Siivonen, J., Taponen, S., Hänninen, L., Pastell, M., Aisla, A. M., & Pyörälä, S. (2008). Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4592-4598.
21. House, J. (2015). The Peripartum Ruminant. In *Large Animal Internal Medicine* (Ed B. P. Smith). Cap 283. St. Louis, Missouri: Elsevier.
22. Martin S. W., Schwabe C. W. and Franti C. E. (1975). Dairy Calf Mortality Rate: The Association of Daily Meteorological Factors and Calf Mortality. *Can J Comp Med*. Oct; 39(4): 377-388.
23. Mee, J. F., Berry, D. P., & Cromie, A. R. (2008). Prevalence of, and risk factors associated with, perinatal calf mortality in pasture-based Holstein-Friesian cows. *Animal*, 2(4), 613-620.
24. Mee, J. (2011). Bovine Neonatal Survival Is Improvement Possible. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 23, 161-174.
25. Mee, J. F. (2013). Why do so many calves die on modern dairy farms and what can we do about calf welfare in the future? *Animals*, 3(4), 1036-1057.
26. Miedema, H. M., Cockram, M. S., Dwyer, C. M., & Macrae, A. I. (2011). Behavioural predictors of the start of normal and dystocic calving in dairy cows and heifers. *Applied animal behaviour science*, 132(1), 14-19.
27. McGuirk SM: Reducing dairy calf mortality. *Proc Am Assoc Bov Pract* 40:126-131, 2007.
28. Nagy, D. W. (2009). Resuscitation and critical care of neonatal calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 25(1), 1-11.
29. Phillips, P. K., & Heath, J. E. (2001). An infrared thermographic study of surface temperature in the euthermic woodchuck (*Marmota monax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 129(2-3), 557-562.
30. National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle: 2001*. National Academies Press.
31. Romano Muñoz, JL., Vázquez-Flores, S. Haubi Segura, CU, Shimada Miyasaka, A. (2018). Capítulo 9. Desórdenes metabólicos del rumiante en el libro de *Nutrición Animal*. 4ª Edición. Editor Armando Shimada Miyasaki Publicado. Editorial Trillas SA de CV, México. pp 277-306. ISBN 978-607-17-31201.
32. Rogers, P. A. M. (1999). Emergency acupoint Renzhong (GV26): A bibliography and review from textbook sources. In *Proceedings of the 25th Annual International Congress on Veterinary Acupuncture* (pp. 83-89).
33. Van Amburgh, M, (2017). Dairy Replacement Heifers: Transitioning from Weaning Through the First Lactation, *ADSA Discover 32 Conferences*.
34. Vasseur, E., Borderas, F., Cue, R. I., Lefebvre, D., Pellerin, D., Rushen, J., Wade, K.M. and De Passillé, A. M. (2010). A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 1307-1316.
35. Vasseur, E., Pellerin, D., de Passille, A. M., Winckler, C., Lensink, B. J., Knierim, U., & Rushen, J. (2012) Assessing the welfare of dairy calves: outcome-based measures of calf health versus input-based measures of the use of risky management practices. *Animal Welfare*, 21(1), 77-86.
36. Vázquez-Flores, S. and C. Lucio-Rodriguez (2017) Early non-invasive clinical diagnosis of hoof ulcers by infrared thermographic images (IRT) in milking dairy cows. ISSN 0022-0302, *Journal of Dairy Science*, 100 (Supplement 2): 27
37. Vermorel, M., Dardillat, C., Vernet, J., & Demigne, C. (1983). Energy metabolism and thermoregulation in the newborn calf. In *Annales de Recherches Veterinaires* (Vol. 14, No. 4, pp. 382-389).
38. Vieira, A. D. P., Guesdon, V., De Passille, A. M., von Keyserlingk, M. A. G., & Weary, D. M. (2008). Behavioural indicators of hunger in dairy calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 109(2), 180-189.

PRESENCIA DE ERO EN EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS DE OVIS ARIES: EFECTO DE LA ZONA PELÚCIDA.

José Enrique Durán Monroy¹, José Ernesto Hernández Pichardo², Demetrio Ambriz García¹ y María del Carmen Navarro Maldonado¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, ²Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. carmennavarro2006@yahoo.com.mx

RESUMEN

La zona pelúcida (ZP), es la matriz extracelular que rodea a los ovocitos y embriones preimplantacionales en los mamíferos. Las principales funciones de la ZP son: unión especie-específica de espermatozoides, evitar la polispermia, proteger al embrión de contaminantes, células inmunitarias y lesiones mecánicas, mantener un microambiente estable y evitar la implantación. En la clonación manual de embriones, es necesario prescindir de la ZP para realizar la enucleación del ovocito y generar así los citoplastos. Por lo que, en este caso, la calidad embrionaria resultante dependerá, en buena medida, del balance entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) y los antioxidantes naturales del embrión. El presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar la presencia de ERO en embriones partenogénicos ovinos con y sin ZP. Doscientos noventa y ocho ovocitos obtenidos de borregas domésticas (*Ovis aries*) sacrificadas en rastro, fueron madurados *in vitro* (MIV) durante 20 horas (84 % de MIV) y activados 6 horas con DMAP para su segmentación (84% de activación). A las 96 horas de cultivo, un grupo de 24 embriones partenogénicos se sometió a digestión con pronasa para retirar la ZP. El grupo control mantuvo la ZP (n=25). Posteriormente los embriones se tiñeron con Diacetato 2-7-diclorofluoreseina (7.5 µM) para evidenciar la presencia de ERO bajo microscopio de fluorescencia (longitud de onda 370 nm). Las imágenes se analizaron con el procesador de imágenes "Imagen J" versión 1.41, mostrando 50% más de fluorescencia en los embriones con ZP, que en los que no la tenían (134,246 vs. 91,372 unidades de intensidad, p<0.05). Se concluye que la ZP participa de manera importante en el balance oxidativo del embrión en etapas previas a la implantación.

INTRODUCCION

La zona pelúcida (ZP) es la matriz extracelular que rodea a los ovocitos y embriones preimplantacionales en los mamíferos. La función principal de la ZP es el reconocimiento del espermatozoide y protección contra la polispermia durante la fertilización, protege la integridad en la reimplantación del embrión y mantiene un microambiente estable para el mismo, además de brindarle al embrión protección en contra de bacterias, hongos, células del sistema inmune y de alguna lesión mecánica, durante el viaje del embrión a través del oviducto (Li *et al.*, 2013).

Durante la clonación manual de embriones de mamíferos, los ovocitos son desprovistos de la zona pelúcida y enucleados utilizando una micronavaja. Durante este procedimiento, los ovocitos enucleados (citoplastos) son unidos a una célula somática (carioplasto), formando así el complejo cario-citoplastos (tripleto celular). Este tripleto es fusionado por medio de corriente eléctrica para posteriormente ser activado químicamente y dar inicio al desarrollo embrionario (Costa-Borges *et al.*, 2006).

Una característica distintiva de los embriones producidos *in vitro* es la alta producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (Hajian *et al.*, 2017). Durante el cultivo de embriones *in vitro*, los niveles de ERO aumentan en el ciclo celular de manera dependiente comparado con los embriones generados *in vivo* en las diferentes etapas del desarrollo embrionario. La producción de ERO es proporcional a la etapa del desarrollo embrionario *in vitro*, debido a cambios metabólicos que se deben a la activación del genoma embrionario (Khan *et al.*, 2017).

Es sabido que embriones que se desarrollan en presencia de su ZP alcanzan mayor porcentaje de segmentación, que aquellos a los que por manejo les tiene que ser retirada. Así mismo, en los embriones que carecen de ZP la concentración de ERO suele ser mayor que en los que la conservan, debido a que los embriones aceleran su metabolismo e intercambian subproductos del mismo con el medio de cultivo después de la eliminación de la ZP (Ebner, 2003).

La utilización de embriones inducidos a la activación y al desarrollo *in vitro*, sin recurrir a la fecundación (embriones partenogenéticos) ha sido una metodología eficiente utilizada comúnmente como control en experimentos de fertilización *in vitro* o de clonación de embriones (Li *et al.*, 2009). El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de ERO en embriones partenogenéticos de *Ovis aries* con zona pelúcida intacta (ZPI) vs embriones partenogenéticos libres de zona pelúcida (ZPL), en la etapa de mórula. Se utilizaron embriones partenogenéticos de *O. aries*, con la finalidad de determinar si la ausencia de ZP en los embriones que se producen por clonación manual de manera rutinaria en nuestro laboratorio, se relaciona con la presencia de ERO que hemos observado en los embriones clones de dicha especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Maduración in vitro de ovocitos de Ovis aries

Se colectaron ovarios de hembras *Ovis aries* adultas tipo criollo sacrificadas en un rastro local. Los ovarios se disecaron con tijeras estériles y posteriormente se transportaron al laboratorio en solución salina (0.9 % NaCl Sigma-Aldrich y 1 % de Antibac-Antifun) a 35 °C. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados dos veces isotérmicamente en solución salina al 0.9 %. La obtención de los ovocitos se realizó mediante la aspiración de los folículos ováricos, con una jeringa desechable estéril de 10 mL que contenía 1 mL de TCM-199 (Tissue Culture Medium 199, por sus siglas en inglés) con Hepes (In Vitro, S.A.) y aguja estéril calibre 20. Los ovocitos recuperados fueron lavados en el mismo medio y posteriormente incubados en una caja de 4 pozos conteniendo medio de maduración a base de TCM-199 suplementado con 15 % de Suero Fetal Bovino (SFB), 1 % de EGF (por sus siglas en inglés Epidermal Growth Factor), 6.5 µg mL⁻¹ de FSH (por sus siglas en inglés Follicle Stimulating Hormone, Folltropin-V, Bioniche), 5 UI mL⁻¹ de HCG (por sus siglas en inglés Human Chorionic Gonadotrophin, Loeffler) y 32.5 µL de Antibac-Antifun, cubierto con aceite mineral. El tiempo de maduración *in vitro* fue de 20 horas a 38 °C y 5% de CO₂ (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015; Wani, 2002).

Activación y cultivo de embriones partenogenéticos de O. aries

Para la activación y cultivo de los embriones partenogenéticos de *O. aries*, los ovocitos madurados fueron sometidos durante 5 min a TCM-199 con Hepes conteniendo 8 µM de Ionóforo de Calcio. Transcurrido este tiempo, fueron lavados 2 veces en T20 (TCM-199 suplementado con 20 % de SFB) y posteriormente incubados en 2 µM de 6-dimetilamino-purina (6-DMAP) durante 4 horas bajo las mismas condiciones de incubación antes mencionadas.

Siguiendo la metodología de Zhang *et al.* (2013) con algunas variantes, una vez realizada la activación y para dar inicio al desarrollo *in vitro* de los embriones partenogenéticos de *O. aries*, se procedió a cultivarlos en cajas de 4 pozos (Nunc) conteniendo 200 µM de medio secuencial Cleavage (Cook Medical). La caja se incubó a 38 °C y 5 % de CO₂ con aire saturado de humedad durante 96 horas (4 días).

Determinación de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO)

A las 96 horas de cultivo, los embriones partenogenéticos de *O. aries* que hubieran alcanzado la etapa de mórula se dividieron en dos tratamientos. De este modo, un grupo de 24 embriones partenogenéticos se sometió a digestión con pronasa para retirar la ZP (ZPL). El grupo control mantuvo la ZP (ZPI) (n=25). Se determinó la presencia de ERO en los embriones partenogenéticos de *O. aries* de ambos grupos. Para ello, se les retiró el medio Cleavage y se les adicionaron 200 µL de TCM-199 suplementado con Hepes, más 7.5 µL de Diacetato 2-7-diclorofluoreseina. Este último fue adicionado a la caja de cultivo en cuarto oscuro, envolviendo las cajas con papel aluminio para protegerlas de la luz. Las cajas se incubaron a 38 °C y 5 % de CO₂ con aire saturado de humedad por 30 min (Kwak *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2014).

Una vez transcurrido ese tiempo, se efectuaron 3 lavados a los embriones de ambos grupos en 50 µL de TCM-199 con Hepes. Después los embriones fueron colocados por separado de acuerdo a los grupos de tratamientos (ZPI, ZPL) en el centro de portaobjetos y alrededor de las muestras se colocaron cuatro puntos de cera, a continuación se colocaron cubreobjetos sobre las muestras teniendo cuidado de no lastimar a los embriones. Por las orillas de los cubreobjetos se hidrataron las muestras con TCM-199 con Hepes y se sellaron colocándoles barniz en las orillas de los cubreobjetos. Se evaluaron las muestras en microscopio de epifluorescencia a 10X, primero en campo claro para la ubicación de los embriones y después con fluorescencia con filtros UV de 370

nm, para determinar la presencia de ERO (Kwak *et al.*, 2012). Se tomaron fotografías de los embriones de los diferentes grupos (ZPI y ZPL), en campo claro y en fluorescencia, en formato jpg y se analizaron con el procesador de imágenes “Imagen J” versión 1.41. Obteniéndose de manera semicuantitativa, el porcentaje de fluorescencia de cada una de las imágenes procesadas.

Análisis Estadístico

Las concentraciones de unidades de fluorescencia de ambos grupos fueron comparados a través de la prueba de Chi –cuadrada con un nivel de significancia de $p < 0.05$

RESULTADOS

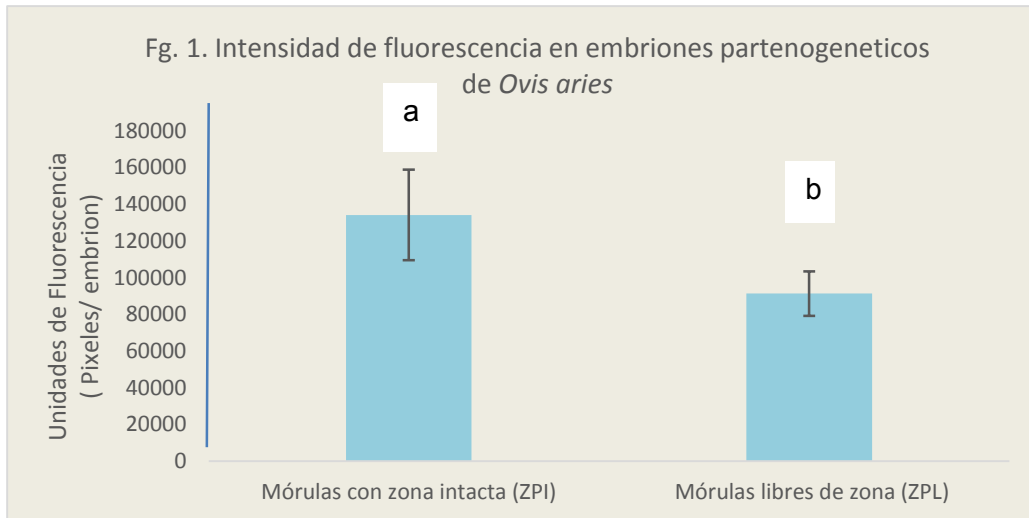
Para la obtención de los embriones partenogenéticos de *O. aries*, se colectaron 135 ovocitos que se sometieron a maduración *in vitro* (MIV) por 20 horas. Posteriormente se evaluaron considerando el criterio de expansión de las células del cúmulo y la extrusión del primer cuerpo polar. El 84.4 % (114/135) de los ovocitos alcanzaron la Metafase II (MIV). Una vez activados y puestos a desarrollarse en embriones partenogenéticos, se observó que 95 (83.3 %) lograron la activación, produciendo embriones partenogenéticos cuyo desarrollo embrionario *in vitro* fue de la siguiente manera: Nueve embriones (9.5 %) no segmentaron, 12 (12.5 %) bloquearon su desarrollo en las etapas de 4, 8 y 12 blastómeros, 25 (26 %) fragmentaron y 49 (52 %) alcanzaron la etapa de mórula (Tabla 1).

Tabla 1. Desarrollo *in vitro* de embriones partenogenéticos de *Ovis aries*.

Experimento	Embriones N	Cigotos N (%)	4-12 céls. N (%)	Fragmentados N (%)	Mórulas N (%)
1	56	9 (16)	7 (12)	14 (25)	26 (46.5)
2	18	0	3 (16.6)	9 (50)	6 (33.3)
3	21	0	2 (9.5)	2 (9.5)	17 (81%)
Total	95	9 (9.5)	12 (12.5)	25 (26)	49 (52)

Cuantificación de ERO en embriones partenogenéticos de O. aries.

De los 49 embriones que alcanzaron la etapa de mórula, 25 se mantuvieron con la ZP intacta (ZPI) y a 24 se les disgregó la ZP (ZPL). El comparativo de resultados de intensidad de fluorescencia en los embriones partenogenéticos de *O. aries* con y sin ZP se muestra en la figura 1. El análisis semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia de las ERO de los embriones partenogenéticos de *O. aries* con ZPI y ZPL, dio como resultado un aumento de 50% más fluorescencia en los embriones con ZPI, que en los libres de zona pelúcida (134,246 vs. 91,372 unidades de intensidad, respectivamente ($P < 0.05$)). La intensidad de fluorescencia en los embriones partenogenéticos de *O. aries* con ZPI se observa en la figura 2, mientras que en la figura 3 se observa la intensidad de fluorescencia en los embriones partenogenéticos de *O. aries* de ZPL.



Literales diferentes entre columnas, muestran diferencia estadística significativa a $p < 0.05$

Fig. 2. Embriones partenogenéticos de *O. aries* en etapa de mórula, con zona pelúcida (ZPI) en campo claro (A-D) y teñidos con 2-7-diclorofluorosceína (E-H).

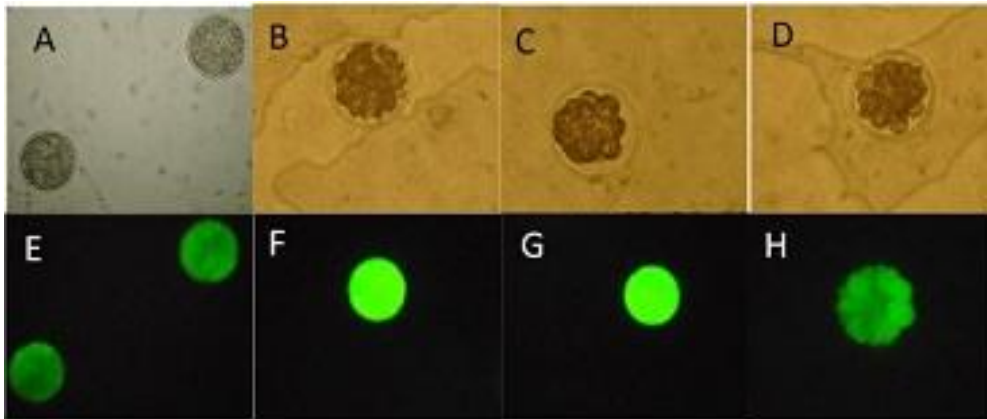
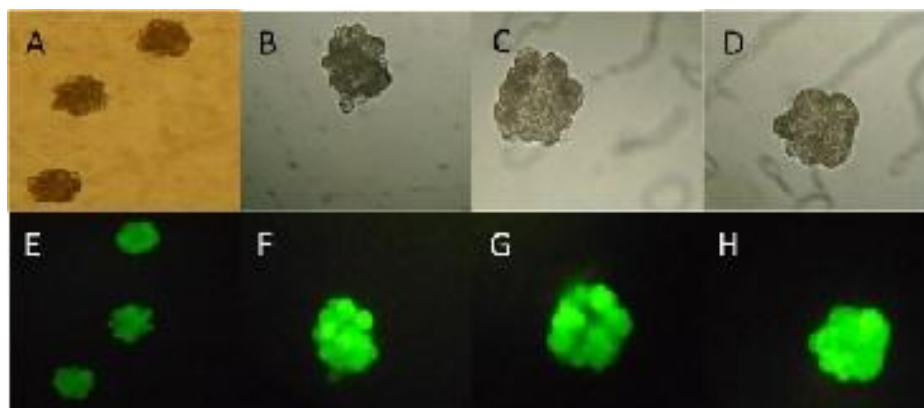


Fig. 3. Embriones partenogenéticos de *O. aries* en etapa de mórula, sin zona pelúcida (ZPL) en campo claro (A-D) y teñidos con 2-7-diclorofluorosceína (E-H).



DISCUSIÓN

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de *Ovis aries* se realizó por un periodo de 20 horas como se describió para bovinos (Gasparrini, 2002), demostrando que el proceso de MIV de los ovocitos de ovinos y bovinos tiene una duración similar. En este estudio, el primer criterio para determinar la MIV de los ovocitos fue la expansión de las células del cúmulo. La maduración nuclear del ovocito se logra cuando alcanza la Metafase II, observándose la placa metafásica y la extrusión del primer cuerpo polar (Collado-Fernandez *et al.*, 2012). Los resultados de MIV encontrados en este trabajo (84.4%), son superiores a lo reportado por Mukherjee *et al.* (2014), quienes lograron 72.6% de MIV en ovocitos de cabra. En cuanto a los resultados en el desarrollo embrionario *in vitro* de embriones partenogenéticos que alcanzaron la etapa de mórula (52 %) los resultados obtenidos fueron menores a los reportados por Li *et al.* (2013), quienes lograron obtener 90 % de embriones partenogenéticos en la etapa de mórula en cerdas.

El encontrar que los embriones partenogenéticos de *O. aries* con ZPI, expresaran mayor cantidad de ERO que los que carecían de ella (ZPL), fue contrario a lo esperado, ya que se ha descrito que existe una relación directa entre la mayor concentración de ERO y el daño celular (Goto *et al.*, 1993). También se ha descrito que los embriones desprovistos de ZP tienen una menor tasa de desarrollo *in vitro* (Li *et al.*, 2013), por lo que se esperaba observar una mayor cantidad de ERO presentes. Sin embargo, la ZP podría funcionar como una barrera para la dispersión de factores embriotóxicos como las ERO hacia el espacio perivitelino del embrión, el cual, alcanzando la etapa de mórula, ha activado el genoma embrionario y en consecuencia ha aumentado su metabolismo energético (Liu *et al.*, 2018). Se sabe que el sitio predilecto de la formación de ERO es la mitocondria, durante la fosforilación oxidativa vinculada al metabolismo energético del embrión. Así pues, si la ZP sirviera como barrera para la dispersión de las ERO, esto podría explicar en parte por qué los embriones desprovistos de ZP tienen una velocidad de desarrollo mayor que los que la conservan, sin que por ello se considere la eficiencia en la segmentación a etapas más desarrolladas, dado que como también se indicó, los embriones que conservan su ZP tienen una mayor eficiencia (el doble) para alcanzar el estado de blastocisto que los que no la conservan.

Sin embargo, es importante descartar un artefacto de acumulación de la 2-7-diclorofluorosceína dentro de la ZP. Si se observan con detenimiento las imágenes de los paneles correspondientes a la Figura 3, se encontrará que los embriones desprovistos de la ZP presentan la fluorescencia en los blastómeros bien definidos (imágenes E-H). En cambio, sí se observa el panel de la Figura 2, en los embriones de las imágenes F y G se aprecia la emisión de fluorescencia en mayor intensidad, es decir, que denotan una mayor concentración de ERO. Además de que no se observa una correcta definición de sus blastómeros. Es importante señalar que en las imágenes E-H de las Figuras 2 y 3, no se observan halos de intensidad alrededor de los embriones, lo que confirma que el excedente de fluorocromo fue adecuadamente retirado y en consecuencia, no sería este el artefacto, reafirmando que quizá quede atrapado dentro de la ZP, aumentando con ello la intensidad de fluorescencia.

CONCLUSIONES

Si bien este estudio dio a conocer la importancia de la ZP en relación con la concentración de ERO en mórulas partenogenéticas de *Ovis aries*, es necesario realizar más estudios que demuestren el papel preciso que juega la ZP en la concentración de ERO, durante el desarrollo embrionario *in vitro* en ovinos domésticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. N Costa-Borges, Santaló J., Ibáñez E. 2006. Preparación de citoplastos receptores para transferencia nuclear mediante enucleación química de ovocitos. *Rev. Iberoam. Fert.* 23:163-172.
2. E. Collado-Fernandez, Picton, H.M., and Dumollard, R. 2012. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int. J. Dev. Biol.* 56:799–808.

3. T. Ebner. 2003. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum. Reprod. Update* 9: 251–262.
4. B. Gasparrini. 2002. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenol.* 57: 237–256.
5. Y. Goto., Noda, Y., Mori, T., and Nakano, M. 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 15: 69–75.
6. HS. Hajian Mehdi, Hosseini, Ostadhosseini Somayyeh, y Esfahani, M.H.N. 2017. Comparative stepwise pattern of reactive oxygen species production during in vitro development of fertilized and nuclear transferred goat embryos. *Int. J. Fertil. Steril.* 11(2): 93–98.
7. I. Khan, Kim, S.W., Lee, K.-L., Song, S.-H., Mesalam, A., Chowdhury, M.M.R., Uddin, Z., Park, K.H. y Kong, I.-K. 2017. Polydatin improves the developmental competence of bovine embryos in vitro via induction of sirtuin 1 (Sirt1). *Reprod. Fertil. Dev.* 29(10): 2011-2020.
8. CH. Kwak, Cheong, S.-A., Jeon, Y., Lee, E., Choi, K.-C., Jeung, E.-B. y Hyun, S.-H. 2012. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenol.* 78: 86–101.
9. R. Li, Liu, Y., Pedersen, H.S., Kragh, P.M., and Callesen, H. 2013. Development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos after removal of zona pellucida. *Theriogenol.* 80: 58–64.
10. C. Liu, Ma, Y., Shang, Y., Huo, R., and Li, W. 2018. Post-translational regulation of the maternal-to-zygotic transition. *Cell. Mol. Life Sci.* 75: 1707–1722.
11. Li, J., Villemoes, K., Zhang, Y., Du, Y., Kragh, P., Purup, S., Xue, Q., Pedersen, A., Jørgensen, A., Jakobsen, J., et al. (2009). Efficiency of Two Enucleation Methods Connected to Handmade Cloning to Produce Transgenic Porcine Embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 122–127.
8. A. Mukherjee, Malik, H., Saha, A.P., Dubey, A., Singhal, D.K., Boateng, S., Saugandhika, S., Kumar, S., De, S., Guha, S.K. 201). Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31: 229–239.
9. MC. Navarro-Maldonado, Hernandez-Martinez, S., Vázquez Avendaño, J.R., Martínez Ibarra, J. L., Zavala-Vega, Vargas-Miranda. B., A., R.-R., J., y Ambriz-García, D. A. 2015. Deriva de células epiteliales de tejido de piel descongelado de ovis canadensis mexicana para la formación de un banco de germoplasma. *Acta Zool. Mex.* 31 (2): 275–282.
10. NA. Wani. 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 44: 89–95.

MAPA PROTEÓMICO COMPARATIVO DE INTESTINOS DE GARRAPATAS *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A IVERMECTINA

Areli López-Esparza¹, E. Rodríguez², G. Aguilar¹

¹Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., areloesparza@gmail.com, gabriela.aguilar@uaq.mx

²CENID Fisiología, INIFAP. Ajuchitlán, Colón, Qro., rodriguez.elba@inifap.gob.mx

RESUMEN

R. microplus es considerado el ectoparásito más importante del ganado bovino en términos de pérdidas económicas y daño a la salud del animal. El desarrollo de químicos con propiedades acaricidas favoreció la adopción de estas sustancias como el principal método de control. Actualmente estos químicos tienen una eficacia limitada en la reducción de las infestaciones debido al desarrollo de poblaciones de garrapatas multirresistentes. La ivermectina (IVM) es el fármaco preferido por los productores por su efecto contra endo y ectoparásitos, sin embargo, se han documentado casos de resistencia a este químico en Brasil, Uruguay y México. Los posibles mecanismos de resistencia de *R. microplus* a la IVM están relacionados con el aumento del metabolismo por citocromo P450, enzimas Glutación S-transferasas y las bombas de flujo ABC; a pesar de ello, actualmente los mecanismos moleculares de resistencia no son claros. El objetivo de este trabajo fue determinar las diferencias en el nivel de expresión de las proteínas intestinales entre garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a IVM; mediante electroforesis bidimensional (2DE) y el análisis de las diferencias en el software PDQuest. Los resultados demuestran que existen al menos dos proteínas diferencialmente expresadas bajo las condiciones analizadas, la primera con pH de 4.5 y masa molecular de 20 kDa y la segunda con pH de 7 y masa molecular de 50 kDa. Este estudio es una primera aproximación a la identificación de posibles biomarcadores involucrados en el mecanismo de resistencia de *R. microplus* a la IVM que permita a futuro diseñar métodos efectivos de control.

INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus microplus es un ectoparásito endémico del ganado en regiones tropicales y subtropicales del mundo, causando grandes pérdidas económicas a productores a través de efectos físicos directos en la parasitación del animal e indirectamente por ser vector de los agentes infecciosos causantes de babesiosis y anaplasmosis bovina, entre otros (Jonsson, 2006).

El desarrollo de químicos con propiedades acaricidas favoreció el uso de estos productos como principal método de control de *R. microplus* (Guerrero *et al.*, 2012); sin embargo, en la actualidad las garrapatas son resistentes a la mayoría de los acaricidas disponibles en el mercado; debido a esto se produjo un incremento en el uso del endectocida ivermectina como alternativa al problema (Lanusse *et al.*, 1997); no obstante, existen informes recientes sobre poblaciones de garrapatas *R. microplus* resistentes a IVM en Brasil (Martins and Furlong, 2001; Klafke *et al.*, 2006), México (Pérez-Cogollo *et al.*, 2010), y Uruguay (Castro-Janer *et al.*, 2011) enfatizando la importancia de comprender los mecanismos de resistencia a la IVM y de esta forma mejorar los métodos de control para estas garrapatas.

TEORÍA

La garrapata del ganado *R. microplus* (Acari: Ixodidae), es uno de los ectoparásitos más importantes en áreas tropicales y subtropicales en el mundo, siendo responsables de considerables pérdidas económicas para la producción ganadera manifestándose a través de la pérdida de sangre y daño a la piel (Jonsson, 2006). Además, es el vector de los agentes infecciosos más importantes del ganado bovino *Babesia spp.* y *Anaplasma spp.* (Kocan *et al.*, 2000; Jonsson *et al.*, 2008).

La selección de resistencia a acaricidas en poblaciones de artrópodos es uno de los principales obstáculos para el control químico de especies vectoras (Rosario-Cruz *et al.*, 2009). A nivel mundial existen casos confirmados de resistencia y multirresistencia en *R. microplus* a diversos acaricidas (Pohl *et al.*, 2011). Por ejemplo en México, se ha desarrollado rápidamente en las últimas décadas; la resistencia a organofosforados (OP) surgió en 1980s, en 1990s emergió para piretroides sintéticos (Fragoso *et al.*, 1995), en 2001 a Amitraz (Am) (Soberanes *et al.*, 2002) y en 2008 se reportó el

primer caso de resistencia a fipronil en el norte de México, y adicionalmente muchas poblaciones de garrapatas con resistencia a múltiples clases de acaricidas (Miller *et al.*, 2008).

Las lactonas macrocíclicas (MLs) son endectocidas eficientes en el control de endo y ectoparásitos (Lanusse *et al.*, 1997); su efecto antiparasitario consiste en activar el canal de cloro dependiente de glutamato (GluCl), incrementando la permeabilidad de la membrana celular por los iones de cloro (Cl⁻), con la consecuente hiperpolarización y parálisis de la musculatura faríngea y somática de los parásitos causando su desprendimiento y muerte (Wolstenholme y Rogers, 2005). A pesar de los resultados positivos de las MLs en términos de control de parásitos, la presión selectiva causada por la masiva aplicación de estos fármacos durante los últimos años ha desencadenado el desarrollo de resistencia en varios parásitos, incluyendo los nematodos *Onchocerca volvulus* (Townson *et al.*, 1994), *Cooperia spp.* (Coles *et al.*, 2001) y *Haemonchus contortus* (Coles *et al.*, 2005), así como los ácaros *Tetranychus urticae* (Kwon *et al.*, 2010) y *Sarcoptes scabiei* (Currie *et al.*, 2004).

Actualmente, la ivermectina (IVM) es la ML mayormente empleada para el control de *R. microplus* (Mendes *et al.*, 2011). La resistencia hacia ésta, se detectó por primera vez en Brasil en 2001 en el estado de Rio Grande do Sul (Martins and Furlong, 2001) y posteriormente en Sao Paulo (Klafke *et al.*, 2006), en Yucatán México fue detectado en ranchos de leche y carne (Pérez-Cogollo *et al.*, 2010) y en ranchos de carne en Uruguay (Castro-Janer *et al.*, 2011). Este fenómeno podría ser explicado por el uso frecuente e indiscriminado, ocasionando la aparición de cepas *R. microplus* resistentes a estos productos (Aguilar-Tipacamú *et al.*, 2016).

Los mecanismos de resistencia en *R. microplus* y otras especies a las MLs aún no es claro; algunos autores sugieren modificaciones en el receptor del canal de cloro dependiente de glutamato (GluCl) interfiriendo en la unión del fármaco a su sitio blanco (McCavera *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2010); y el incremento del metabolismo oxidativo que facilita la eliminación del fármaco del organismo (Argentine *et al.*, 1992). La resistencia a IVM se asocia a la sobreexpresión de los genes *mip-1* y *pgp-1* en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (James y Davey, 2009) y *pgp-1* en el ácaro *S. scabiei* (Mounsey *et al.*, 2010), además estudios en *R. microplus* demostraron la participación de las proteínas de transporte ABC en la detoxificación de las células como mecanismo de resistencia a la IVM (Pohl *et al.*, 2011); otros probables mecanismos que se están investigando son el incremento de la detoxificación metabólica mediada por esterasas, monooxigenasa citocromo P450 y glutatión-S-transferasa (Pohl *et al.*, 2011).

La problemática actual de resistencia a los diferentes acaricidas del mercado, requiere de propuestas innovadoras que ayuden a mitigar el problema. Aunque la genómica ha dominado el área de investigación biomédica durante las décadas pasadas, la proteómica ha ganado terreno en este ámbito. La razón fundamental para ello es el hecho de que el patrón proteico de una muestra biológica es más informativo sobre el estado fisiológico de un organismo que su genoma. El proteoma de un organismo es un elemento altamente dinámico, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimento celular que se estudie y estos, a su vez, puede cambiar debido a alteraciones en su ambiente (Pando y Ferreira, 2009). Con la finalidad de controlar a *R. microplus* y los patógenos que transmite, se han analizado proteínas del intestino de garrapatas, para el desarrollo de vacunas contra este ectoparásito (Kongsuwan *et al.*, 2010). A la fecha no existe ningún estudio proteómico similar a éste donde se analicen las proteínas expresadas en *R. microplus* al ser tratadas continuamente con los distintos fármacos empleados en el campo, por lo que un análisis proteómico comparativo partiendo de una cepa de *R. microplus* susceptible presionada continuamente con IVM, permitirá observar el patrón de proteínas que se van expresando diferencialmente durante todo el tratamiento; para así generar información sobre las proteínas que podrían estar involucradas en los mecanismos de resistencia a este producto. Además, es importante integrar estos resultados con la implementación de métodos más promisorios para reducir las poblaciones de garrapatas; este control consiste en aplicar sistemáticamente dos o más métodos de control de plagas, que afecten negativamente a una especie hospedadora, disminuyendo el número de aplicaciones de productos químicos y reduciendo los riesgos sobre la salud humana y ambiental (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

PARTE EXPERIMENTAL

*Obtención de intestinos de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM.*

Para esta investigación se emplearon dos cepas de *R. microplus*; la cepa susceptible a la IVM "Media Joya" producida en el CENID-PAVET INIFAP, la cual es utilizada como referencia y se caracteriza por ser fenotípicamente susceptible a todos los ixodicidas, las garrapatas resistentes a IVM se obtuvieron generacionalmente de la cepa susceptible presionada continuamente con IVM utilizando subdosis (50µg/kg de peso) en un bovino tal y como se describe por Klafke (2006) y colaboradores. Las intestinos se obtuvieron de hembras semi-repletas; para lo cual se infestó un bovino con 0.5g de larvas resistentes a IVM y otro bovino con 0.5g de larvas susceptibles a IVM; ambas cepas mantenidas en el laboratorio bajo condiciones controladas. Entre los 17 y 19 días post-infestación se colectaron las garrapatas para la disección de intestinos. Las garrapatas se lavaron con agua corriente y se desinfectaron con una solución de cloruro de benzalconio al 10%. La disección de los intestinos se realizó siguiendo la metodología descrita por Edwards *et al.*, (2009). Una vez separados los intestinos se colocaron ocho de éstos en un tubo eppendorf de 1.5 ml mantenido en hielo con PBS y cóctel de inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail). Las muestras se almacenaron a -80 °C.

*Extracción y purificación de proteínas de intestinos de *R. microplus**

Viales de ambas cepas se descongelaron y se lavaron con PBS (pH 7) centrifugado a 1,800 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se tomó y se le añadió cóctel de inhibidores de proteasas, se mezcló por agitación y se dejó actuar por 15 minutos. El lisado se centrifugó a 1,800 rpm por 5 minutos. El extracto de proteínas totales se colectó de la capa intermedia, se tomaron 100 µl de cada muestra y se purificó mediante el kit comercial, ReadyPrep 2-D Cleanup. Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry con el kit RC DC Protein Assay.

Preparación de las muestras

Las proteínas se prepararon a una concentración de 250 µg, la cual se disolvió en un volumen total de 125 µL con buffer de rehidratación para electroforesis 2DE. Con esta muestra se hidrataron tiras IPG de 7 cm con rango de pH de 3-10.

Electroforesis 2DE

La separación de las proteínas mediante un gradiente de pH en primera dimensión, se realizó por isoelectroenfoque (IEF). El protocolo se efectuó de la siguiente manera:

	Voltaje	Tiempo	Ramp	µAmp
Paso 1	250	40 min	Lineal	50
Paso 2	4000	3 hrs	Lineal	50
Paso 3	4000	10,000 V/hr	Rápido	50
Paso 4	500	-	Constante	-

Antes de la separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular, se equilibró la tira IPG en amortiguador de equilibrio.

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. El gel se preparó al 12 %; se colocó la tira en el gel y sobre la preparación se añadió agarosa al 0.5 % con azul de bromofenol para sellarla. El gel se electroforó a 80 V por tres horas, con amortiguador de electroforesis de proteínas. El gel de doble dimensión se tiñó con azul de Coomassie R-250 bajo las condiciones del proveedor.

Análisis de los geles de doble dimensión mediante el programa PDQuest

Los mapas proteómicos se compararon en el programa PDQuest. Los puntos se detectaron al sobreponer las imágenes de los geles con el gel maestro previamente obtenido. A la imagen cruda del gel maestro se le restó fondo, se filtró y se obtuvo el modelo gaussiano. Los datos se normalizaron mediante un modelo de regresión lineal con un nivel de significancia de 2, lo que redujo la variación entre cada uno de los geles.

RESULTADOS

La separación de proteínas de intestinos de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM por electroforesis bidimensional (2DE) están representados en la Fig. 1. En los geles se observaron varias proteínas que varían su expresión con rangos de masas relativas de entre 90-20 kDa y pH de 5-7 para todos los tratamientos. Se identificaron nueve proteínas diferencialmente expresadas entre los tratamientos comparados, éstas fueron seleccionadas para su análisis estadístico en el programa PDQuest Advanced (Fig. 1B). El análisis reveló proteínas estadísticamente diferentes respecto al nivel de intensidad de píxeles entre el grupo susceptible a IVM y los grupos resistentes de las generaciones evaluadas (Fig. 2); la primera con un pH aparente de 4.5 y una masa molecular relativa

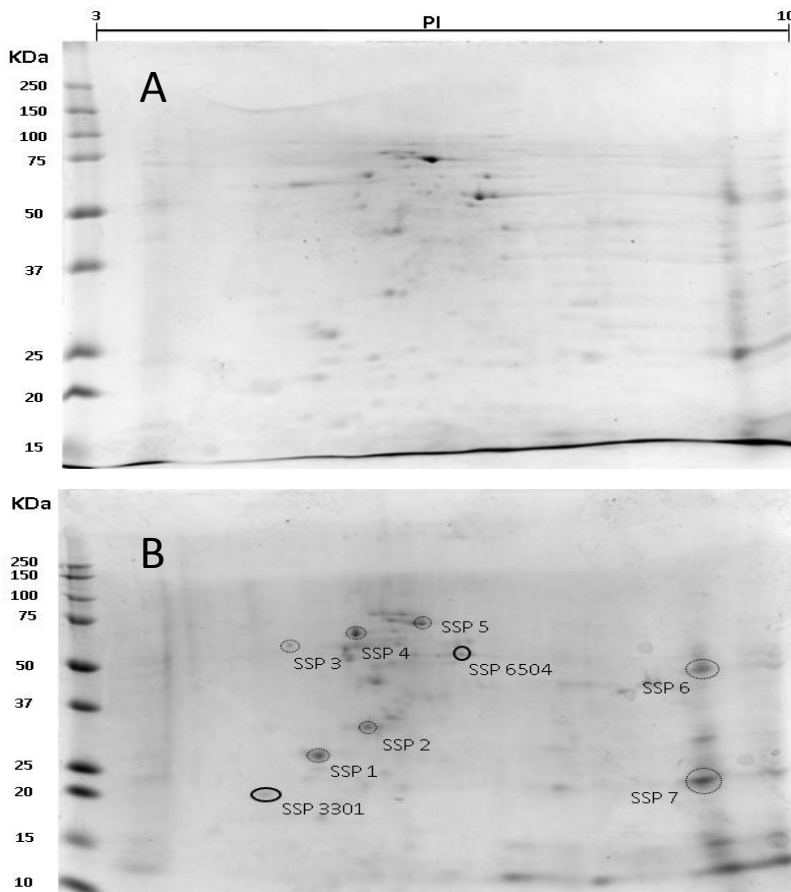


Fig. 1. Separación bidimensional de proteínas extraídas de intestinos de *R. microplus* susceptibles a IVM (A) y resistentes a IVM (B). En círculos las proteínas expresadas diferencialmente entre tratamientos, se analizaron mediante el software PDQuest Advanced,

de 20 kDa se mostró sobre expresada en la segunda generación de garrapatas resistentes en relación con la primer generación presionada con IVM y la cepa susceptible (Fig. 2A); este resultado posiblemente podría tener relación con lo reportado por Pohl y colaboradores (2011) quienes investigaron los niveles de transcripción de proteínas transportadoras ABC en el intestino medio de garrapatas hembras *R. microplus* semirrepletas de una cepa susceptible y una resistente a IVM, observando un incremento significativo en el nivel de transcripción de ABCB10 en hembras resistentes comparadas con las susceptibles; en la literatura se reporta que subunidades de esta proteína tienen una masa molecular de entre 30-50 kDa (Wilkins, 2015). Así mismo, este resultado podría sustentarse con lo obtenido en la investigación realizada por Rosario-Cruz y colaboradores (2000), donde cepas de garrapatas resistentes a acaricidas de la familia de los piretroides sintéticos (PS) y organofosforados (OPs) mostraron una actividad de esterasa incrementada en relación con

la cepa susceptible; el ensayo de isoelectroenfoque mostró diferencias en la expresión de varias isoformas con actividad de esterasa, que fueron detectadas dentro del rango 4.0 a 5.0 de pH; además Liu y Scott (2002) mencionan que dentro de los mecanismos de resistencia metabólica, el más común incluye la detoxificación de PS por la sobreexpresión de enzimas citocromo P450 cuya masa molecular oscila entre los 50 y 60 kDa. La segunda proteína con diferente grado de expresión entre tratamientos tuvo una masa molecular relativa de 50 KDa y un pH aparente de 7, en este caso la proteína se mostró en mayor cantidad en la cepa susceptible y fue notable una disminución progresiva en su expresión en la primer y segunda generación de garrapatas presionadas con IVM.

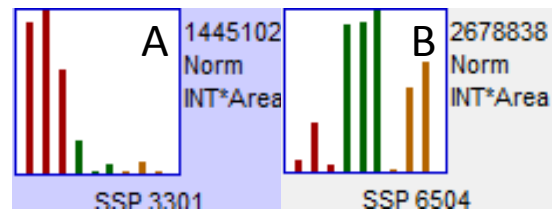


Fig. 2. Intensidad de área de dos proteínas expresadas diferencialmente (proteína 1 con leyenda SSP 3301/ proteína 2 con leyenda SSP 6504) entre la cepa *R. microplus* susceptible a IVM (verde), generación 1 cepa resistente a IVM (amarillo) y generación 2 cepa resistente a IVM (rojo).

CONCLUSIONES

Existen al menos dos proteínas intestinales diferencialmente expresadas en las garrapatas presionadas con IVM en comparación con las garrapatas *R. microplus* susceptibles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Tipacamú, G., Mosqueda-Gualito, J., Cantó-Alarcón, G., Klafke, G., Arellano-Carvajal, F., Alonso-Díaz, M., Rodríguez-Vivas, R.I. (2016). Identificación de mutaciones en el canal de cloro dependiente de glutamato en *Rhipicephalus microplus* resistente y susceptible a las ivermectinas. *Quehacer Científico en Chiapas*, 11(2).
2. Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Niell, C., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T.T.S. (2011). Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 178, 148–155.
3. Fox, L.M. (2006). Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 588–593.
4. Guerrero, F.D., Lovis, L., Martins, J.R., (2012). Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 1–6.
5. Jonsson, N.N., (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.* 137, 1–10.
6. Klafke, G.M., Sabatini, G.A., de Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., Schumaker, T.T. 2006. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 142, 386–390.
7. Lanusse, C., Lifschitz, A., Virkel, G., Alvarez, L., Sánchez, S., Sutra, J.F. (1997). Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 20(2), 91-99.
8. Liu, N., Scott, J.G. (1998). Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem Molec.* 28, 531-535.
9. Martins, J.R., Furlong, J. (2001). Ivermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.* 149, 64.

10. Perez-Cogollo, L.C., Rodriguez-Vivas, R.I., Ramirez-Cruz, G.T., Miller, R.J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet. Parasitol.* 168, 165–169.
11. Pohl, C.P., Klafke, M.G., Carvalho, D.D., Martins, J.R., Daffre, S., Da Silva, I.V., & Masuda, A. (2011). ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal of Parasitology.* 41, 1323-1333.
12. Rodríguez-Vivas, R.I, Alonso-Díaz, M.A, Rodríguez-Arevalo, F, Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V.M., Rosario-Cruz, R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 136(3-4), 335-442.
13. Rodríguez-Vivas, R.I, Rodríguez-Arevalo, F., Alonso-Díaz, M.A., Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V.M., Rosario-Cruz, R. (2006). Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico. *Prev Vet Med* 75(3-4): 280-286.
14. Rodríguez-Vivas, R.I., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Pérez-Cogollo, L.C., Trinidad-Martínez, I., Bolio-González, M.E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recur. agropecuarios*, 1(3).
15. Rosario-Cruz, R., García-Vázquez, F., George-Edward, J. (2000). Detección inmunoquímica de esterases en dos cepas de la garrapata *Bophilus microplus* (Acarii: Ixodidae) resistentes a ixodicidas. 203-210.
16. Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000 Prime Reports* 7(14), 1-9.

EFFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE COCCIÓN SOBRE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN VAINA DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus Vulgaris* L.)

Ramón Rumayor-Zacarías¹, Selene Ramírez-Martínez¹, Elvia Cruz-Huerta², Vicente Velásquez-Melgarejo¹, Patricia Polanco-Medina³, José Cruz Carrillo-Rodríguez⁴, Elia Nora Aquino-Bolaños²

¹Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México.

²Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas, Maestría en Ciencias Alimentarias, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México.

³Universidad Veracruzana, Facultad de Nutrición, Médicos y Odontólogos S/N, Unidad del Bosque, Xalapa, 91017, Veracruz, México.

⁴Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Ex-Hacienda Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, 71230 Oaxaca, México.

RESUMEN

La vaina de frijol es el fruto inmaduro de la planta *Phaseolus vulgaris*, su color varía de tonos verde a morado, presenta forma aplanada y alargada, en cuyo interior se encuentran las semillas. Contiene diversas vitaminas, minerales y fitoquímicos como los compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes que tienen un papel importante en la defensa frente al envejecimiento y enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, el cáncer y enfermedades cardiovasculares. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes métodos de cocción sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en vaina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Los métodos de cocción fueron vapor durante 15 y 18 min y ebullición durante 2 y 5 min. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con mayor cantidad de polifenoles fue vapor durante 18 min (6.79 mg EAG g⁻¹ bs). Con relación al contenido de antocianinas, el tratamiento en ebullición durante 2 min presentó la mayor concentración (0.79 mg Cyn-3-Glu g⁻¹ bs). El tratamiento de ebullición durante 5 min mostró la mayor actividad antioxidante (22.66 µmol ETrolox 100 g⁻¹ bs). La intensidad del color aumentó en ambos tratamientos, mejorando su aspecto. Se concluye que la aplicación del tratamiento térmico puede mejorar las características de la vaina de frijol, debido a que ayuda a la liberación de compuestos fenólicos aumentando la actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son una fuente importante de proteínas, aminoácidos esenciales, fibra dietética, vitaminas, minerales y fitoquímicos como los compuestos fenólicos. Se ha demostrado en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que los compuestos fenólicos, están estrechamente asociados a una amplia gama de efectos positivos para la salud, destacando su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensiva, antimicrobiana y anticancerígena (Dueñas *et al.*, 2015; Kan *et al.*, 2018).

La vaina de frijol, es el fruto inmaduro del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) que pertenece a la familia de las leguminosas. Presenta forma aplanada y alargada, en cuyo interior se encuentran las semillas. También son una fuente importante de vitaminas, aminoácidos, minerales, fibra y compuestos fenólicos como flavonoles, ácidos fenólicos y antocianinas que le confieren actividad antioxidante (Baardseth *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Además de la capacidad antioxidante, los compuestos fenólicos actúan través de interacciones directas con receptores que intervienen en la transducción de señales, propiciando una serie de efectos favorables para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas y neurodegenerativas (Jung *et al.*, 2014). El efecto de los compuestos fenólicos en el organismo está condicionado principalmente por la cantidad ingerida, el proceso digestivo, la biodisponibilidad y el procesado del alimento (deshidratación, cocción) (Lewandowska *et al.*, 2013; Bohn *et al.*, 2014).

Los métodos más utilizados para la cocción de vainas de frijol son: ebullición, vapor, salteado y microondas. Estos procesos de cocción provocan una serie de cambios en las características físicas y químicas de las hortalizas (Turkmen *et al.*, 2005). Así mismo, se ha reportado que la cocción puede causar degradación térmica de los compuestos fenólicos. Sin embargo, también se ha descrito que puede aumentar el contenido de polifenoles totales al inactivar la enzima polifenol oxidasa o liberando polifenoles unidos a fibra, mejorando así su biodisponibilidad (Palermo *et al.*, 2014; Preti

et al., 2017). Recientemente, se ha informado sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en varios vegetales frescos y sometidos a diferentes métodos de cocción (Dolinsky *et al.*, 2016). Sin embargo, hay poca información o se desconoce el efecto que los métodos de cocción ejercen sobre los compuestos fenólicos y actividad antioxidante en vainas de frijol de poblaciones nativas que se cultivan en México y en particular en el estado de Oaxaca.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes métodos de cocción sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en vaina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Se analizaron vainas de frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.) cosechadas en la comunidad de San Pablo Huitzo, municipio de San Pablo Huitzo, Oaxaca, México, con latitud N 17° 16' 35" y longitud O 96° 52' 57", con una altitud de 1647 msnm.

Métodos de cocción

Ebullición

Se utilizaron 20 g de vaina sin granos de frijol, se sumergieron en 2 litros de agua destilada a 97 °C durante 2 y 5 minutos de cocción. Después se retiró el agua y se colocaron en un baño de hielo para detener la cocción. Posteriormente se eliminó el excedente de agua para obtener los extractos.

Vapor

Se pesaron 20 g de vaina sin granos de frijol, se colocaron en una vaporera digital (37530Z Hamilton Beach) a 97 °C durante 15 y 18 minutos de cocción. Después fueron retirados y sumergidos en un baño de hielo para detener la cocción. Por último, se les retiró el exceso de agua para obtener los extractos.

Obtención de los extractos

Extracto etanólico:

La extracción de las muestras para el análisis del contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante se obtuvieron a partir de 5 g de vaina de frijol tratada y 25 ml de solución etanol-agua al 80 % (V/V), las muestras se homogeneizaron (Nutribullet, NBR-12XX, LA, E.U.A.) durante 1 minuto. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm a 4 °C durante 20 min (Hettich zentrifuge, Universal 32R, Tuttlingen, Alemania) y por último el sobrenadante se filtró a través de filtros Whatman N° 1 y se almacenó a 4 °C en ausencia de luz hasta su análisis.

Extracción con agua

La extracción con agua se llevó a cabo utilizando 1 g de vaina de frijol tratada y 50 ml de agua destilada que fue homogeneizada durante 1 minuto. Después se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de filtros Whatman N° 1 y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

Polifenoles totales

La cantidad de compuestos fenólicos se determinó de acuerdo con el método descrito por Singleton y Rossi (1965). Se agregaron 0.4 ml del extracto etanólico, 1 ml de agua destilada y 0.2 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar durante 8 minutos. Posteriormente se adicionaron 2 ml de Na₂CO₃ al 7% (p/v) y 1.4 ml de agua destilada. Se agitó con un vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Jenway, modelo 6305, Bibby Scientific Ltd, United King). El experimento se llevó a cabo por cuadruplicado y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg eq. ácido gálico g⁻¹ bs).

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada por el método de Brand-Williams *et al.* (1995). En un tubo de ensaye se añadió una alícuota de 2.9 ml del radical DPPH (2,2-difenil-picril-hidracilo) (6 mg de DPPH) y 100 ml de metanol-agua al 80% (v/v) y 0.1 ml del extracto etanólico de la muestra. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm. La actividad antioxidante se expresó en µmol de Trolox por gramo de muestra en base seca (µmol de Trolox g⁻¹ bs).

Antocianinas monoméricas

La cuantificación de antocianinas monoméricas se realizó mediante el método de pH diferencial descrito por Giusti y Wrolstad (2001) con algunas modificaciones. Se utilizó cloruro de potasio 1 N a pH 1 y acetato de sodio 1 N a pH 4.5, los cuales fueron adicionados a 0.6 ml de muestra, llevándolos a un volumen final de 3 ml. Después se midió la absorbancia a 510 y 750 nm. El valor de la absorbancia total de antocianinas se calculó de la siguiente forma: $A = (A_{max} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 1}} - (A_{max} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 4.5}}$ Dónde: A_{max} es la máxima absorbancia, mientras que A_{700} es la lectura dada a esa absorbancia.

La concentración de antocianinas se estimó con la ecuación: $\text{Antocianinas} = (A \cdot PM \cdot FD \cdot 1000) / (\epsilon \cdot l)$, donde A es la absorbancia a 510 nm; PM es el peso molecular para cianidina (449.2 g mol⁻¹) FD es el factor de dilución, ϵ es el coeficiente de extinción molar (26900 g mol⁻¹cm⁻¹) y l es la longitud de la trayectoria de la celda (1 cm).

Color

Se evaluó mediante el sistema CIE Lab usando un espectrofotómetro para sólidos (Konica-Minolta, modelo CM-2600d, Osaka, Japón). Registrando los valores de L^* , a^* y b^* .

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con un nivel de significancia del 5% a través de un diseño experimental multifactorial donde el factor fue el método de cocción realizando réplicas de cada tratamiento. Se compararon las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey, con un nivel de confianza del 95% utilizando el programa estadístico Minitab 17 (2017).

RESULTADOS

Polifenoles

Las vainas de frijol frescas mostraron una concentración de polifenoles totales de 9.19 mg EAG g⁻¹ bs. Este valor fue mayor a lo informado por Bouzari *et al.* (2015) de 2.23 mg EAG g⁻¹ bs en vaina de frijol (*Phaseolus vulgaris*, tipo Blue Lake) cultivados en Davis, California. Después de someter las muestras a los métodos de cocción se pudo observar que el tratamiento con vapor fue el que presentó una menor degradación de polifenoles. El tratamiento de cocción con vapor a los 15 minutos presentó valores de 6.15 mg EAG g⁻¹ bs. Valor similar a lo descrito por Jiratanan y Liu (2004) quienes indicaron una disminución del 40% de estos compuestos (mg EAG g⁻¹ bs) en ejote comercial, después de tratarlos con calor (115 °C) durante diferentes tiempos de cocción. Sin embargo, al someter las muestras a cocción con vapor durante 18 minutos la concentración de polifenoles aumentó a 6.79 mg EAG g⁻¹ bs. Probablemente se debe a que, durante la cocción, los enlaces de ácidos fenólicos son liberados por la acción mecánica de la despolimerización de las ligninas (Gohn *et al.*, 2012). Por otro lado, en el tratamiento de ebullición durante 2 minutos presentó la mayor degradación de polifenoles totales con valores de (4.86 mg EAG g⁻¹ bs), esto probablemente al carácter polar de estos compuestos ya que generalmente las mezclas para la extracción se realizan con soluciones de agua en diferentes proporciones (Isaza, 2007), provocando que parte de estos compuestos se pierdan en el agua de cocción. Por otro lado, las el tratamiento con agua en ebullición durante 5 min presentó valores de 5.18 mg EAG g⁻¹ bs).

Generalmente, los cambios en los polifenoles totales se han atribuido principalmente a reacciones de degradación, isomerización, epimerización y lactonización que ocurren durante el tratamiento térmico de los alimentos.

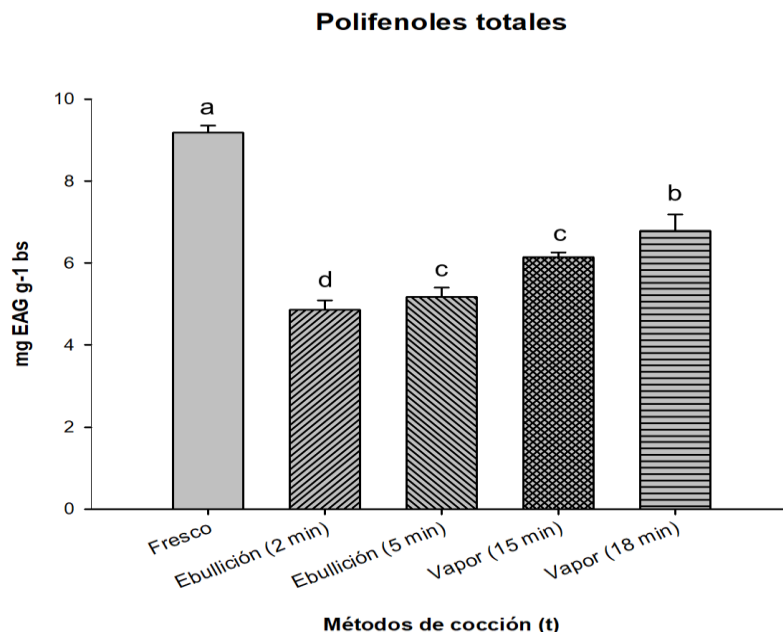


Figura 1. Efecto de los métodos de cocción sobre el contenido de polifenoles totales en vaina de frijol. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $P < 0.05$).

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante en vainas frescas fue de 20.30 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100 \text{ g bs}$). Estos valores se incrementaron al aplicar los tratamientos térmicos. Las vainas de frijol sometidas a cocción con vapor durante 15 min presentaron valores de 22.66 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100 \text{ g bs}$ y las tratadas con vapor durante 18 min presentaron 20.58 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100 \text{ g bs}$. Mostrando una disminución en la actividad antioxidante al aumentar el tiempo de cocción. Una situación similar fue descrita por Cervantes-Paz *et al.* (2012) en chiles jalapeños (*Capsicum annuum cv. Marajá*) que al someterlos a cocción durante 12.48 min a 94 °C la actividad antioxidante disminuyó. Por otro lado, las vainas de frijol sometidas a cocción con agua en ebullición a los 2 min presentaron valores de 21.74 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100 \text{ g bs}$ y en la cocción con agua en ebullición a los 5 min 24.77 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100 \text{ g bs}$ presentado un aumento significativo en la concentración de actividad antioxidante. El comportamiento de la actividad antioxidante durante el tratamiento con agua en ebullición y con vapor fue similar al descrito por Chumyam *et al.* (2013) en berenjena (*Solanum melongena var. Muang Lek*).

Probablemente este efecto ocurre debido a la aplicación de calor a la muestra que provocó una destrucción térmica de las paredes celulares y compartimientos subcelulares, liberándose compuestos que aumentaron la actividad antioxidante (Maeda *et al.* 1992) Por otro lado, este incremento en la capacidad antioxidante podría atribuirse a la disminución de la actividad prooxidante de enzimas como la peroxidasa la cual se inactiva a altas temperaturas (Turkmen *et al.* 2005). A pesar de que los compuestos fenólicos tuvieron una alta degradación, la actividad antioxidante no mostró disminución al aplicarle los métodos de cocción, Probablemente porque existen otros compuestos que promueven la capacidad antioxidante, tales como las vitaminas (E, C, B y K) y algunos minerales (Mn, Zn, Cu, Se y Fe) (Drabrowska y Moya-Mir, 2009).

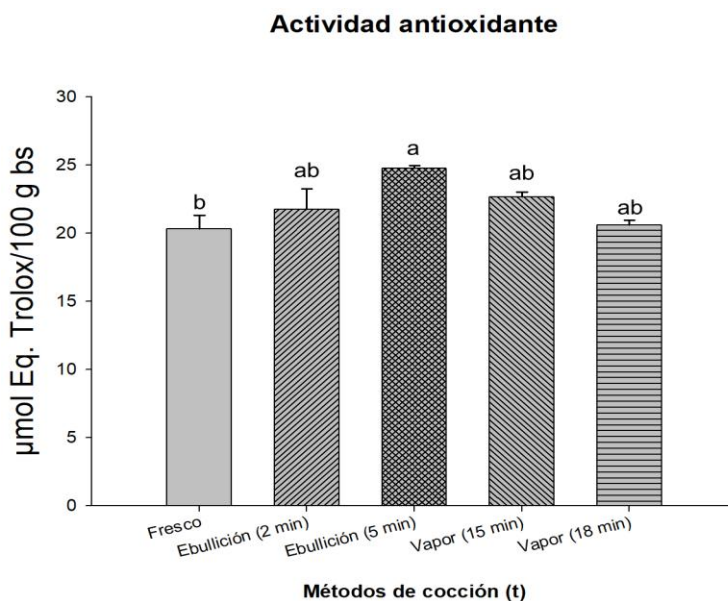


Figura 2. Efecto de los métodos de cocción sobre la actividad antioxidante en vaina de frijol. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $P < 0.05$).

Antocianinas

En tejido fresco la concentración de antocianinas obtenida de la vaina de frijol fue de 3.72 mg Cyn-3-Glu g^{-1} bs. Sin embargo, después de someterse a los métodos de cocción presentó una disminución de estos compuestos. En la cocción con agua en ebullición, el tratamiento durante 2 min fue el que mostró la menor pérdida de antocianinas con un valor de 0.92 mg Cyn-3-Glu g^{-1} bs, pero al aumentar el tiempo de cocción a 5 minutos la concentración disminuyó a 0.69 mg Cyn-3-Glu g^{-1} bs. Por otro lado, el tratamiento con vapor durante 15 min mostro una mayor disminución de antocianinas (0.47 mg Cyn-3-Glu g^{-1} bs) no obstante, al aumentar el tiempo de cocción a 18 min se observó un incremento de estos compuestos (0.79 mg Cyn-3-Glu g^{-1} bs). La pérdida de estos compuestos puede atribuirse a que las antocianinas son un grupo de pigmentos rojizos hidrosolubles que se conjugan con los glucósidos y su destrucción depende del pH y la temperatura, dificultando su conservación durante procesos térmicos (Jen, 1989).

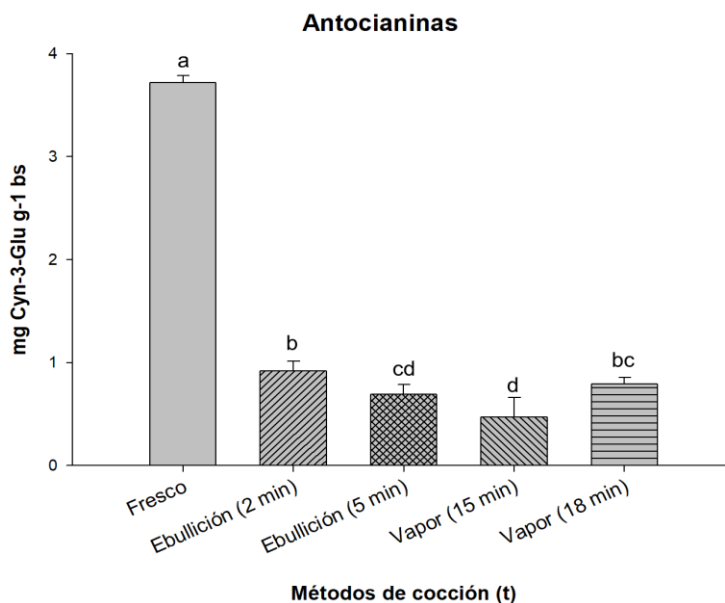


Figura 3. Efecto de los métodos de cocción sobre la actividad antioxidante en vaina de frijol. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $P < 0.05$).

Color

El color es uno de los atributos más importantes en la aceptación de los alimentos por el consumidor. La luminosidad (L^*) de las vainas de frijol frescas estuvieron en un intervalo de 41.2 - 43.7. Estos valores fueron relativamente similares a los descritos por Martins *et al.* (2002) con 38.0 en vainas frescas obtenidas en Oporto, Portugal.

En relación con la cromaticidad (C^*) la saturación del color aumentó al aplicar cada tratamiento, siendo el método de cocción con vapor durante 18 min el que presentó la mayor intensidad de color con valores de 11.25. Por otra parte, el ángulo de matiz (h°) mostró diferencias entre el tejido fresco (con valores de 60.06) y los tratados por los métodos de cocción (con valores de entre 102.30 - 120.00). Así mismo, al aplicar los tratamientos térmicos existieron variaciones hacia tonos verde y amarillo.

La degradación del color verde durante los métodos de cocción, probablemente es consecuencia de la ruptura irreversible de la clorofila, sin embargo el color verde de los vegetales puede ser estabilizado con el incremento de la concentración de los iones metales, como el cobre o complejos de zinc que forman compuestos como la clorofila cúprica que ayudan a estabilizar la coloración (Martins *et al.* 2002).

Cuadro 1. Efecto de los métodos de cocción sobre los parámetros de color en vaina de frijol.

Tratamiento	L^*	C	h°
Fresco	41.72 ± 0.93 ^a	4.59±0.94 ^c	60.06±22.28 ^b
Ebullición (2 min)	41.44 ± 0.46 ^a	9.91±0.52 ^{ab}	120.00±2.04 ^a
Ebullición (5 min)	41.20 ± 1.45 ^a	10.55±1.45 ^{ab}	116.14±2.04 ^a
Vapor (15 min)	41.09 ± 1.5 ^a	9.10±0.61 ^b	103.32±1.28 ^a
Vapor (18 min)	43.71 ± 1.57 ^a	11.25± 0.23 ^a	102.30±0.97 ^a

Valores promedio (+ error estándar) con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$).

CONCLUSIÓN

El método de cocción y el tiempo aplicado, influyeron en el contenido de compuestos con actividad antioxidante en las muestras de vaina de frijol común. En este estudio el tratamiento que presentó

mejores resultados fue el de cocción con ebullición durante 5 min. Es importante realizar más estudios para ampliar el conocimiento sobre el contenido y la conservación de estos compuestos con actividad antioxidante en alimentos que previamente a su consumo son sometidos a tratamientos térmicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Association of Official Analytical Chemists. 1990. 15th edición. AOAC, Washington, DC
2. Baardseth, P., Bjerke, F., Martinsen B K., and Skrede, G. 2010. Vitaminos C, total phenolics and antioxidative activity in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and swede rods (*Brassica napus* var. *napobrassica*) processed by methods used in catering. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:1245-1255.
3. Bohn, T. 2014. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*. 72: 429-452.
4. Bouzari, A., Holstege, D., and Barrett M., D. 2015. Mineral, Fiber, and Total Phenolic Retention in Eight Fruits and Vegetables: A Comparison of Refrigerated and Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 951-956.
5. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28: 25-30.
6. Cervantes-Paz, B., Yahia M., E., Ornelas-Paz, J., Gardea-Béjar A., Ibarra-Junquera, V., and Pérez-Martínez, J. D. 2012. Effect of Heat Processing on the Profile of Pigments and Antioxidant Capacity of Green and Red Jalapeño Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10822-10833.
7. Chumyan, A., Whangchai, K., Jung K., J., Faiyue, B., and Saengnil, K. 2013. Effects of heat treatments on antioxidant capacity and total phenolic content of four cultivars of purple skin eggplants. *Science Asia* 39: 246-251.
8. Dolinsky M., Agostinho C., Ribeiro D., De Souza R.G., Girão B.S., Ferreirab D., Polinatic R., Ciarellid G. and Fialho E. 2016. Effect of different cooking methods on the polyphenol concentration and antioxidant capacity of selected vegetables. *Journal of Culinary Science & Technology*. 2016 14: 1-12.
9. Dueñas, M., Martínez-Villaluenga, C., Limón, R.L., Peñas, E., Frias, J. 2015. Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Research International* 70:55-63.
10. Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry* F1.2.1-F1.2.13.
11. Isaza M., J. H. 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica Año XIII*. 53:13-18
12. Jen J.J. 1989. Chemical Basis of Quality Factors in Fruits and Vegetables. *Quality Factors of Fruits and Vegetables*. 1-9 pp.
13. Jiratanan, T. and Liu H., R. 2004. Antioxidant Activity of Processed Table Beets (*Beta vulgaris* var, *conditiva*) and Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2659-2670.
14. Jung, H S; Lim, Y. and Kim, E K. 2014. Therapeutic phytogetic compounds for obesity and diabetes. *Nutrients* 15: 21505-21537.
15. Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Bai, Z., Wang, J., Zhou, Y., Jiang, J., Zeng, Q., Song, K. 2018. Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chemistry*
16. Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E; Janecka, A and Gorlach, S. 2013. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 12183-12199.
17. Maeda, H., Katsuki, T., Akaike, T. and Yasutake, R. 1992. High correlation between lipid peroxide radical and tumor-promoter effect: Suppression of tumor promotion in the Epstein-Barr virus/B-lymphocyte system and scavenging of alkyl peroxide radicals by various vegetable extracts. *Japan Journal of Cancer Research* 83: 923-928.
18. Martins, R. C., & Silva, C. L. M. 2002. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *International Journal of Refrigeration* 25: 966-974.

19. NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma mexicana. Dirección general de normas.
20. Palermo, M., Pellegrini, N., and Fogliano, V. 2014. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1057-1070.
21. Preti, R., Rapa, M., and Vinci, G. 2017. Effect of steaming and boiling on the antioxidant properties and biogenic amines content in green bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties of different colours. *Journal of Food Quality* 1-8.
22. Ramírez B. C. A. 2009. Experimental de la desactivación de la enzima peroxidase durante el proceso de escaldado de papas (*Solanum Tuberosum*) y el almacenamiento a -18°C. Tesis Profesional. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp 54.
23. Singleton V., Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybde phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
24. Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food chemistry* 93: 713-718.
25. Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Liu, Q., & Tsao, R. 2015. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry* 172: 862-872.

PRODUCCIÓN DE METANO A PARTIR DE RESIDUOS DE PLANTA DE FRESA

Saraí Camarena Martínez¹, Graciela M.L. Ruiz Aguilar¹, Adriana Saldaña Robles¹, Juan Humberto Martínez Martínez², Vicente Javier Álvarez Villafaña¹, Héctor Gordon Núñez Palenius¹, Nanh Lovanh³

¹ División Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato., ² Instituto Tecnológico Superior de Abasolo. ³ United States Department of Agriculture, Bowling Green.

RESUMEN

El estado de Guanajuato destaca por su producción de fresa ocupando el tercer lugar a nivel nacional en su producción, no obstante, los residuos procedentes de la cosecha de este cultivo no son aprovechados. La producción de biogás utilizando residuos agrícolas como sustrato es una alternativa viable para generar energía limpia y a su vez disponer adecuadamente estos desechos. Hasta el momento no se ha encontrado información sobre la producción de biogás usando como sustrato la parte aérea de la planta de fresa. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de producción de metano a diferentes temperaturas (25, 29 y 39°C) y relaciones sustrato/inóculo (S/I), (0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 en peso de sólidos volátiles) a partir de tallos y hojas de la planta de fresa. Las condiciones más adecuadas para la producción de metano fueron a una relación S/I de 2.0 a 39°C obteniéndose un rendimiento de 199.9 mLCH₄/ g SV. En general el incremento de temperatura favorece la producción de metano y conforme se incrementa el valor S/I disminuye el rendimiento de producción de biogás.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la humanidad ha recurrido a los combustibles fósiles (petróleo, gas natural y carbón) para cubrir sus necesidades energéticas en forma desmesurada. Estos recursos son no renovables, por lo que su suministro no está garantizado además de que generan contaminación ambiental desde su extracción, transformación y hasta su combustión (McKinley, 2003).

Es por ello que deben buscarse otras alternativas para generar energía a partir de fuentes renovables. Entre estas alternativas se encuentra la producción de biogás mediante la digestión anaerobia de biomasa residual. La biomasa es materia orgánica que proviene de un proceso biológico y es considerada como la fuente de energía renovable más abundante en el planeta (Zhang, 2008). La biomasa residual incluye subproductos derivados de las actividades agrícolas, ganaderas y forestales (Castells y Cadavid et al., 2005).

De acuerdo a un estudio realizado por Valdez-Vázquez et al., en el 2010, en México se generó cerca de 76 millones de toneladas de biomasa provenientes de diversos cultivos (Valdez-Vázquez et al., 2010). Estos residuos, constituidos por plántulas, hojas, cascaras y tallos, pueden ser aprovechados a través de la tecnología de la digestión anaerobia para la producción de metano (Valdez-Vázquez et al., 2010; Weiland, 2010).

Sin embargo, en el estudio realizado por Valdez-Vázquez únicamente se consideró la biomasa residual procedente de los 20 productos agrícolas que mayormente se producen a nivel nacional, no obstante, existen otros cultivos con gran impacto socio-económico en el estado de Guanajuato como el cultivo de fresa. Guanajuato ocupa el tercer lugar en su producción (SAGARPA, 2017) y se estima que en el 2014 se llegó a generar alrededor de 136 mil toneladas de residuos de esta planta en el estado (Ingeniería Agrícola, 2008; SIAP, 2014).

Los estudios que se han desarrollado para la producción de biogás a partir de residuos de fresa se limitan a la utilización de desechos del fruto. En dichas investigaciones se enfocaron en la evaluación de la codigestión entre residuos de procesadoras de pescado o efluentes de planta de tratamiento de aguas residuales con desechos de frutilla (Siles et al., 2013; Serrano et al., 2014; Serrano et al., 2015). Hasta el momento no se han hallado referencias de investigaciones en los que se emplee residuos de planta de fresa para la producción de biogás.

Para conocer el potencial de producción de metano, el objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de los factores temperatura y relación sustrato/inóculo (S/I) sobre producción de metano a partir de residuos de planta de fresa en un proceso de digestión anaerobia.

PARTE EXPERIMENTAL*Recolección del sustrato*

El sustrato empleado consistió en hojas y tallos de planta de fresa las cuales fueron recolectadas en los invernaderos ubicados en los planteles de la División Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato. El sustrato se secó a temperatura ambiente durante 15 días hasta llegar a una humedad de 7.0 ± 0.5 %. La planta seca se molió en un molino marca SURTEK y se tamizó hasta conseguir un tamaño de partícula de 0.85 mm.

Caracterización del sustrato

Se determinó para la caracterización del sustrato el contenido de carbono orgánico por el método de ignición (Dean, 1974), nitrógeno total y proteína mediante el método Kjeldahl; carbohidratos estructurales (Van Soest et al., 1973), azúcares reductores (Ajani, 2011); demanda química de oxígeno (DQO) mediante el método de reflujo cerrado (APHA 5220D); pH (Kang et al., 2014); y sólidos totales y sólidos volátiles de acuerdo a la NMX-AA-034-SCFI-2001.

Producción de biogás

Los experimentos de producción de metano se realizaron en botellas serológicas de 120 mL de volumen total y un volumen de trabajo de 80 mL en un régimen en lote durante 30 días sin agitación. Se manejó una concentración de inóculo del 20% (p/p) el cual se recolectó de un biodigestor activo alimentado con estiércol vacuno que opera a temperatura ambiente y se encuentra ubicado en el Área Experimental para la Sustentabilidad de la División Ciencias de la Vida. Posteriormente se añadió la cantidad de sustrato correspondiente a las diferentes relaciones S/I evaluadas (0.5, 1.0, 2.0 y 3.0). Las mezclas se completaron a un volumen de 80 mL con medio mineral cuya composición por litro fue KH_2PO_4 4.8g, K_2HPO_4 6.98g, NH_4Cl 6.0 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, CaCl_2 0.02 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.015g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.005g, $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.125mg (Lara et al., 2014). El sustrato utilizado para el control positivo fue estiércol vacuno a una relación S/I 2 y al control negativo no se le añadió sustrato.

Para evaluar la producción de gas metano se llevaron a cabo dos experimentos. En el “Experimento 1” se consideró únicamente la influencia del factor “relación S/I” (0.5, 1.0 y 2.0) sobre la producción de metano manejando una temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$). Posteriormente se realizó el “Experimento 2” en el cual, se incluyeron los factores “relación S/I” (2.0 y 3.0) y “Temperatura” (29 y 39°C) en un diseño factorial 2^2 . Los tratamientos correspondientes al Experimento 1 y Experimento 2 se muestran en a Tablas 1 y 2 respectivamente. Para analizar las diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos se aplicó el método de Tukey con un valor alfa de 0.05 utilizando el software de Statgraphics Centurion XVI.

Tabla 1. Tratamientos incluidos en el Experimento 1 para la producción de biogás a partir de residuos de planta de fresa (F).

Tratamiento	S/I (g SV / g SV)
F 0.5	0.5
F 1	1.0
F 2	2.0

Tabla 2. Tratamientos incluidos en el Experimento 2 para la producción de biogás a partir de residuos de la planta de fresa (F).

Tratamiento	S/I (g SV / g SV)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)
F 2-29 $^\circ\text{C}$	2.0	29
F 2-39 $^\circ\text{C}$	2.0	39
F 3-29 $^\circ\text{C}$	3.0	29
F 3-39 $^\circ\text{C}$	3.0	39

El volumen de biogás producido en los experimentos llevados a cabo se determinó por desplazamiento de agua utilizando una bureta invertida de 50 mL (Sánchez, 2007). El total de gas acumulado correspondió a la sumatoria de cada colecta.

El análisis de cromatografía de gases se realizó en un cromatógrafo PerkinElmer ® modelo Clarus 580, con una columna capilar Elite CG GS-MOSIEVE 52 (30m x 0.53 mm x 50 µm) y utilizando un detector tipo TCD. Las temperaturas del inyector, horno y detector fueron 150, 50 y 200 °C respectivamente. Se utilizó argón como fase móvil a una presión de 14 psi.

RESULTADOS

Caracterización de sustrato

En acuerdo con la caracterización, se obtuvo una relación Carbono/Nitrógeno (C/N) de 30.7. La relación C/N es un indicador de la degradación del sustrato y el rango óptimo recomendado para este parámetro es de 20-30. Se recomiendan estos valores para prevenir la deficiencia de nitrógeno durante el proceso lo que provocaría la disminución de tasa de síntesis celular o bien, prevenir una acumulación de nitrógeno en la mezcla que da lugar a la formación de amonio. El amonio es un compuesto que puede atravesar las membranas celulares de las bacterias metanogénicas inhibiendo su actividad y, por ende, la producción de metano (Varnero et al., 2011).

Se obtuvo un contenido de SV de 78.7 % (base seca), el cuál es un indicador de que este sustrato posee cantidad adecuada de material fermentable (Kumar, 2013).

El contenido de lignina de la planta de fresa (10.5% base seca) fue similar a lo reportado por otros autores para planta de maíz, caña de azúcar y trigo (Varnero et al., 2011; Li et al., 2013). La presencia de lignina indica que la tasa de hidrólisis del sustrato puede ser baja, es decir, que la conversión de materia orgánica compleja a compuestos solubles más simples puede ser limitada por la presencia de este compuesto. La lignina es un componente de la pared celular vegetal y le provee de rigidez y resistencia a ataques microbianos, por lo cual es difícil su degradación provocando una inhibición del proceso de digestión anaerobia a medida que aumenta su contenido en el sustrato (Zheng et al., 2014).

El pH más adecuado para llevar a cabo el proceso de digestión anaerobia es de 6,8 a 7,2 (Ward et al. 2008; Mao et al., 2015). El valor de pH obtenido para planta de fresa fue de 6.1, a pesar ser un valor por debajo de lo recomendado no fue necesario añadir algún aditivo como NaOH o bicarbonato ya que al mezclar el sustrato con el inóculo se neutralizó la mezcla.

La DQO reportada para carbohidratos o residuos vegetales como forraje de sorgo y paja de trigo es de aproximadamente 1.2 g DQO/g SV, por lo que el sustrato de planta de fresa presenta menor contenido de materia orgánica (0.9 g DQO/g SV), lo cual se traduce en un menor potencial de producción de metano con respecto a otros sustratos lignocelulósicos (Sambusiti et al., 2013).

Los resultados de la caracterización del sustrato se encuentran resumidos en la siguiente tabla.

Tabla 3. Caracterización de los residuos de la planta de fresa (F).

Parámetro	F
C/N	30.7 ± 1.5
ST (%) ¹	92.8 ± 0.5
SV (%) ²	78.7 ± 1.5
Celulosa (%) ²	19.5 ± 1.1
Hemicelulosa (%) ²	14.3 ± 1.3
Lignina (%) ²	10.5 ± 0.7
Azúcares reductores (%) ²	11.2 ± 0.3
DQO (mg/g SV)	908.0 ± 47.5
pH	6.1 ± 0.01

¹ Porcentaje base húmeda, ² Porcentaje base seca

*Producción de biogás***a) Experimento 1**

Los tratamientos F 1.0 y F 2.0 fueron estadísticamente similares de acuerdo al análisis de varianza de una sola vía, en cambio, el tratamiento F 0.5 resultó ser estadísticamente superior con respecto a los otros dos tratamientos empleando un valor alfa de 0.05.

En la Figura 1, se muestran las curvas de producción de metano durante un periodo de incubación de 30 días para cada uno de los tratamientos evaluados y los controles. Se puede observar que solo en el tratamiento F 0.5 se llega a alcanzar un rendimiento de producción muy similar al Control (+). A pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos F 1.0 y F 2.0 se puede observar que conforme aumenta la relación S/I, el rendimiento de producción de biogás parece ir disminuyendo. En ninguno de los tratamientos se presentó una inhibición del proceso de digestión anaerobia, ya que la tendencia de producción de biogás aumenta conforme transcurre el tiempo. La mayor parte del biogás acumulado se produjo en los primeros 14 días después de haber iniciado el proceso.

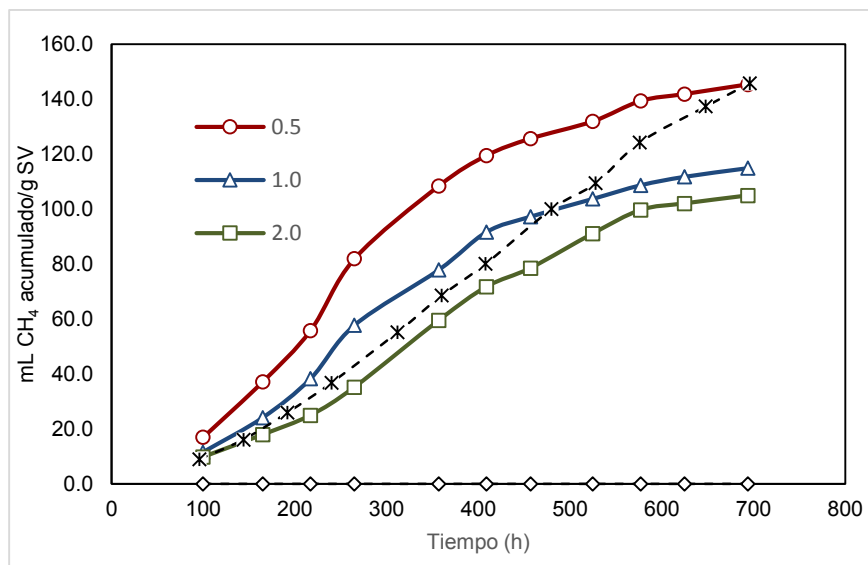


Figura 1. Producción de gas metano (mL CH₄ acumulado/ g SV) a partir de residuos de la planta de fresa de los tratamientos incluidos en el Experimento 1.

En el tratamiento F 0.5 se obtuvo un rendimiento de producción de metano de 145.38 mL CH₄/ g SV, esto representa un 26.5% mayor producción de energía con respecto al tratamiento F 1.0 y un 39.1% con respecto al tratamiento F 2.0 (Figura 2).

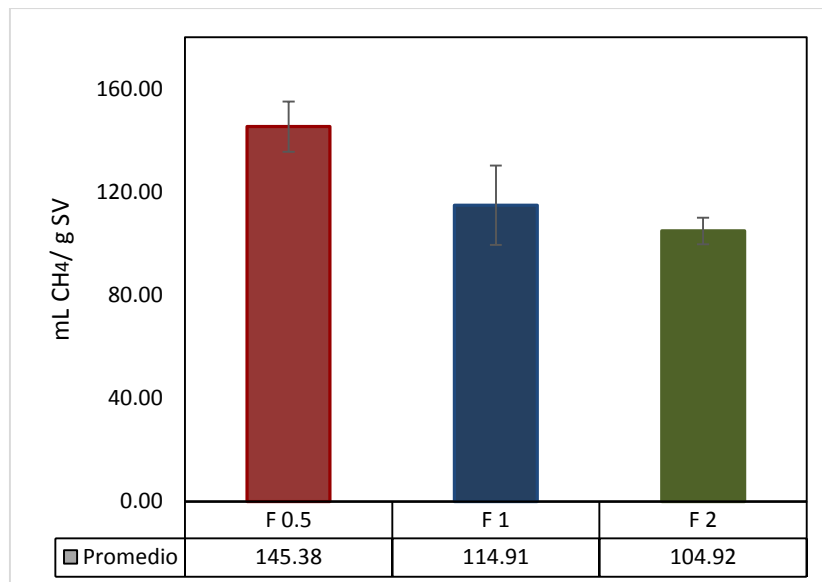


Figura 2. Rendimiento de producción de CH_4 (mL/g SV) empleando residuos de la planta de fresa de los tratamientos incluidos en el Experimento 1.

b) Experimento 2

El propósito de este experimento fue determinar si al ir aumentando la cantidad de sustrato con respecto al inóculo, el rendimiento de producción de biogás se mantenía similar o disminuía drásticamente.

El rendimiento de producción de CH_4 por g SV a una relación S/I 2.0 fue significativamente mayor con respecto a una relación S/I de 3.0. Lo anterior con base a los resultados estadísticos empleando un valor alfa de 0.05.

Se observó que existe diferencia significativa entre las distintas temperaturas evaluadas, siendo la temperatura de 39°C en la que se presenta un mayor rendimiento de producción de energía de acuerdo a la diferencias de medias por el método de Tukey ($\alpha=0.05$).

En el gráfico de Interacciones (Figura 3) se puede observar que la producción de gas metano a una relación S/I de 2.0 se ve más favorecida a una temperatura de 39°C , caso contrario a lo que ocurre a una relación S/I de 3.0, ya que la producción de metano a la temperatura más alta disminuye significativamente. Esto se debió a que un aumento de temperatura puede ser contraproducente cuando se manejan valores altos de relación S/I, puesto que el exceso de carga orgánica se solubiliza en mayor medida provocando una acumulación de ácidos grasos volátiles (AGVs) que acidifica el proceso. Esto se corroboró al medir el pH de la mezcla al cabo de 30 días de incubación, el cual fue de 5.6.

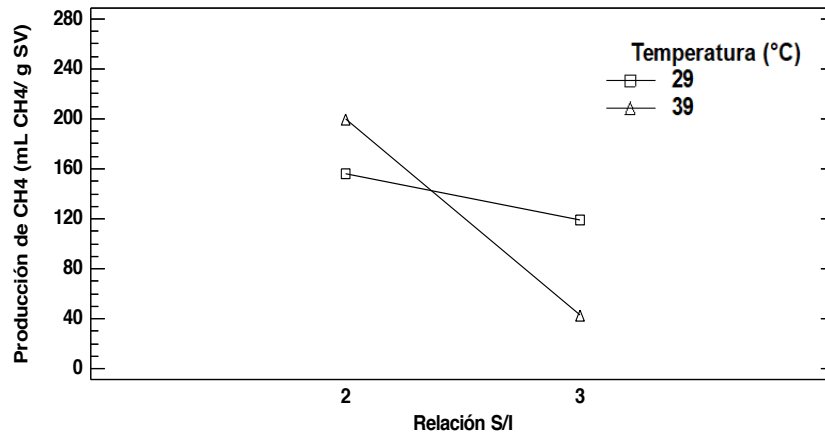


Figura 3. Gráfico de interacciones para el factor "Relación S/I" en la producción de CH₄ a partir de la digestión anaerobia de residuos de la planta de fresa (F).

F 3-39°C fue el único tratamiento donde se presentó una disminución del pH (de 6.6 a 5.6), todos los demás tratamientos se mantuvieron estables a un pH neutro.

En la Figura 4 se observa que en los tratamientos J 2-29°C, J 2-39°C y J 3-29°C, la producción más alta de biogás fue durante las primeras 360 horas (15 días) y a partir de esta medición la producción diaria de metano comienza a disminuir. Este resultado coincide con lo que se obtuvo en el experimento anterior. Para el tratamiento 3-39°C se presenta una inhibición del sistema a las pocas horas de incubación. Nótese que el tratamiento 2-39°C es el único en el cual se llega a obtener un rendimiento similar al Control (+), los demás tratamientos presentan un rendimiento por debajo del obtenido a partir del control.

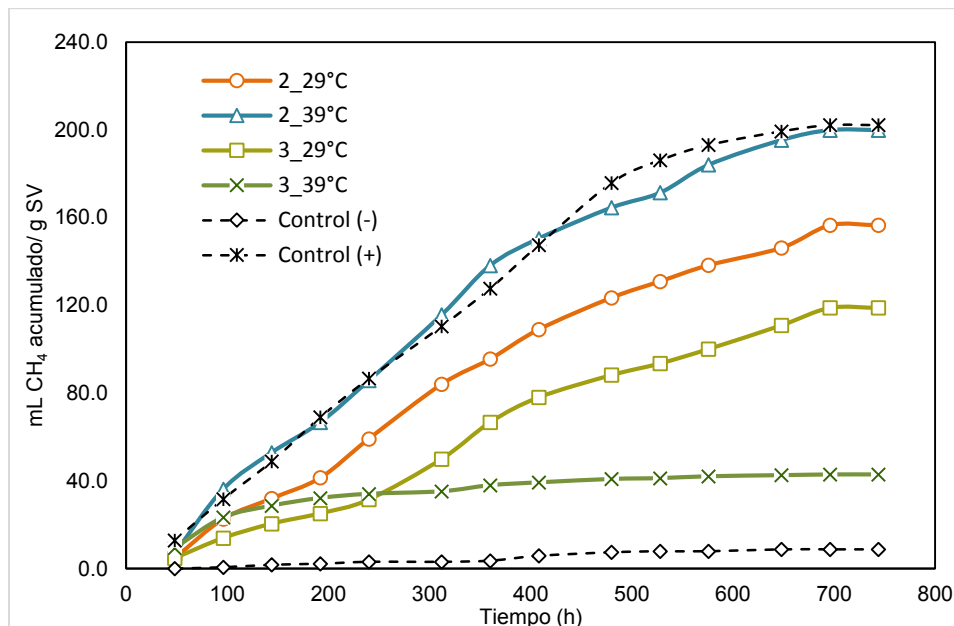


Figura 4. Producción de gas metano (mL CH₄ acumulado/ g SV) obtenida en los tratamientos incluidos en el Experimento 2.

En el tratamiento F 2-39°C se obtuvo 199.9 mL CH₄/ g SV, es decir, el rendimiento fue 27.8% más alto con respecto al tratamiento F 2-29°C y 68.2% con respecto a F 3-29°C tal y como se indica en la Figura 5.

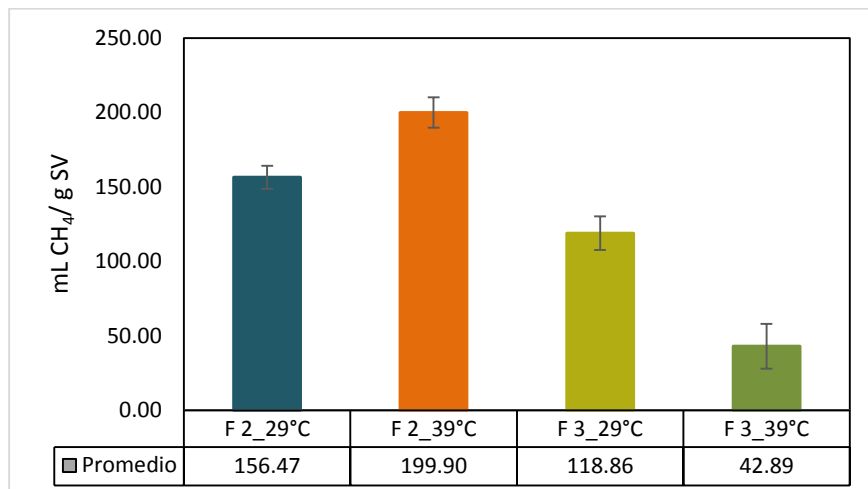


Figura 5. Rendimiento de producción de CH₄ (mL/g SV) a partir de residuos de la planta de fresa de los tratamientos incluidos en el Experimento 2.

Al comparar el rendimiento de producción de gas metano del mejor tratamiento del Experimento 1, (F 0.5), con respecto al mejor tratamiento del Experimento 2 (F 2-39°C), este último se considera el más adecuado para llevar a cabo el proceso de digestión anaerobia puesto que se obtuvo 37.5% más producción de energía.

El incremento de la temperatura permitió un aumento de casi el doble de producción de gas metano al comparar los tratamientos con el mismo valor S/I, F 2-39°C (Experimento 2) y F 2.0 (Experimento 1).

Para incrementar la producción de metano a partir de planta de fresa es incluir un tratamiento biológico previo al proceso de digestión anaerobia con la finalidad de disminuir el contenido de lignina. El aplicar un pretratamiento a la biomasa provoca la ruptura de la barrera impuesta por la presencia de lignina, permitiendo que la hemicelulosa, celulosa y otros hidratos de carbono queden expuestos y sean más accesible a las enzimas secretadas por los microorganismos durante la hidrólisis del sustrato (Mao et al., 2015). No obstante, en esta investigación se logró la producción de biogás a partir de residuos de planta de fresa sin aplicar un pretratamiento.

CONCLUSIONES

Se logró obtener un rendimiento de producción de metano de 199.9 mL/ g SV a una relación S/I de 2.0 a 39°C a partir de planta de fresa. No fue necesario llevar a cabo una codigestión para suplementar el sustrato o bien, realizar algún pretratamiento del mismo. Para incrementar la producción de energía, podría ser recomendable apoyarse en diferentes estrategias siempre y cuando facilite la degradación del sustrato sin implicar un alto costo adicional para mejorar el proceso.

La producción de metano a partir de residuos de planta de fresa parece ser una alternativa viable para el aprovechamiento de estos residuos que hasta el momento no tienen ningún valor comercial.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. R. Lara, A. Sánchez, I. Vázquez. "Hydration treatments increase the biodegradability of native wheat straw for hydrogen production by a microbial consortium". *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, 39: 19899-19904.

2. A. Serrano, J.A. Siles, A.F. Chica, M.A. Martín, "Agri-food waste valorization through anaerobic co-digestion: fish and strawberry residues". *Journal of Cleaner Production* 54, 2013, 125-132.
3. A. Serrano, J.A. Siles, M. C. Gutiérrez, M.A. Martín, "Improvement of the biomethanization of sewage sludge by thermal pre-treatment and co-digestion with strawberry extrudate". *Journal of Cleaner Production* 90, 2015, 25-33.
4. A.O. Ajani, S.E. Agarry, and O.O. Agbede. 2011. "A comparative kinetic study in acid hydrolysis of wastes cellulose from agricultural derived biomass". *Journal of Applied Science of Environmental Management*. 15: 531-537.
5. AIE. Agencia Internacional de Energía. Extraído en abril de 2017 desde: <http://datos.bancomundial.org/indicador/EG.USE.ELEC.KH.PC?locations=MX>
6. C. Mao, Y. Feng, X. Wang, G. Ren. "Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 45, 2015, 540-555.V
7. G. McKinley, "The Local Benefits of Global Air Pollution Control in Mexico City, Final Report of the Second Phase of the Integrated Environmental Strategies Program in Mexico", 2003
8. I. Valdéz, J.A. Acevedo, C. Hernández. "Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico" *Renew Sustain Energy Rev.*, 14, 2010, 2147-2153
9. J. Kang, K. Kim, G. Oh, S. Rhee, "Analysis on biochemical methane potential of agricultural byproducts with different types of silage storage". *J Mater Cycles Waste Manag.* 2013.
10. J.A. Siles, A. Serrano, A. Martín, M.A. Martín, "Biomethanization of waste derived from strawberry processing: advantages of pretreatment". *Journal of Cleaner Production* 42, 2013, 190-197.
11. M. T. Varnero, "Manual de biogás". Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2011.
12. N. Sánchez. "Producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas por vía fermentativa". Tesis profesional 2007, IPICYT, División de Ciencias Ambientales. San Luis Potosí, México.
13. P. J. Van Soest, J.B. Robertson, B.A Lewis. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition". *Journal of Dairy Sciences*. 1991. 74: 3583-3597.
14. P. Weiland, "Biogas production: current state and perspectives". *Appl Microbiol Biotechnol.*, 85, 2010, 849-860
15. SAGARPA, 2017. Atlas agroalimentario. Extraído en abril de 2017 desde: <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>
16. Sambusiti, F. Monlau, E. Ficara, H. Carrere, F. Malpeo. "A comparison of different pre-treatments to increase methane production from two agricultural substrates". *Applied Energy* 104, 2013, 62-70.
17. SIAP, 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA, México. Extraído en abril de 2017 desde: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
18. V. Kumar, V. Sridevi, K. Rani, M. Sakunthala and C. S. Kumar. "A review on production of biogas, fundamentals, applications & its recent enhancing techniques". *Elixir Chem. Engg.* 57, 2013, 14073-14079
19. W. Dean, "Determination of Carbonate and Organic Matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: Comparison with other methods". *Sedim. Petrol.*, 1974 242-248
20. X. E. Castells, C. Cadavid, "Clasificación de la biomasa, en Tratamiento y valorización energética de residuos." Ediciones Díaz de Santos, 2005, P 118.
21. Y. Zheng, J.Zhao, F. Xu, and Y. Li, "Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion*" *Science*, 2014, 42: 35-53.
22. Y.H.P. Zhang, "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnololy.*, 35, 2008, 367-375.

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE PIGMENTOS

M Flores-González, J Águila-López, J. F. Sánchez-Ramírez, M Sánchez -Esgua, G Cruz-Nicolás, J. S. Veloz- Rendón.

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, CIBA-IPN-Tlaxcala.
maribelfloresg@hotmail.com

RESUMEN

Los actinomicetos constituyen un importante grupo de microorganismos (Gram-positivo), los cuales están ampliamente distribuidos en el medio ambiente. El género principal de este grupo es: *Streptomyces*, cuyas especies suelen excretar antibióticos primordialmente, sin embargo se ha observado que también pueden ser productores de pigmentos como parte de su metabolismo secundario (Quiñones-Aguilar y cols., 2016).

Recientemente se ha incrementado el interés por el uso de colorantes a partir de fuentes naturales, puesto que el uso de colorantes sintéticos ha sido severamente cuestionados, por estar ligados a el desarrollo de enfermedades, lo que ha provocado que en diferentes áreas de la industria principalmente la alimenticia, se genere la necesidad de sustituir los colorantes artificiales por naturales (Wang F., *et al.*, 1997).

Para este estudio se realizaron muestreos de suelo en diferentes localidades del estado de Tlaxcala, se aislaron 17 cepas de actinomicetos, productoras de pigmentos.

La extracción del pigmento se realizó a partir de maceración y probando diferentes solventes para su extracción, la mayor cantidad del pigmento se extrajo con alcohol, comparado con la cantidad de pigmento extraído con agua, acetona y éter de petróleo.

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha incrementado el interés por el uso de colorantes a partir de fuentes naturales, principalmente en la industria alimenticia ya que el uso de colorantes sintéticos en alimentos ha sido severamente cuestionado en países desarrollados, debido al consumo indiscriminado de estos pigmentos los cuales están ligados con el desarrollo de enfermedades degenerativas como algunos tipos de cáncer, lo que ha provocado que en diferentes áreas de la industria principalmente la alimenticia, se genere la necesidad de sustituir los colorantes artificiales por colorantes naturales (Wang F., *et al.*, 1997).

Una fuente alternativa para la obtención de pigmentos naturales puede ser a partir de microorganismos, como son: hongos y bacterias, que proporcionan una fuente muy amplia pero poco investigada para la extracción de pigmentos, por lo que esto genera como consecuencia el desarrollo de nuevas tecnologías y la producción de nuevos pigmentos (Carvalho *et al.*, 2003).

Él tiene el interés para obtener nuevos colorantes naturales principalmente para el sector alimenticio, puede ser debido a la fuerte demanda del consumidor para tener productos más naturales, en la actualidad en la Unión Europea solo se autorizó aproximadamente 43 colorantes para alimentos, mientras que en Estados Unidos solo se aprobaron aproximadamente solo 30 colorantes de los cuales la gran mayoría son extraídos a partir de plantas (Council of the European Union, 1994).

En la industria textil también existe un gran interés en los colorantes naturales para los procesos de tinción de fibras naturales y sintéticas, sin embargo en muchos procesos de tinción, los pigmentos naturales extraídos de fuentes naturales como: plantas, ramas, hojas, flores, raíces, frutos etc., no tienen buena fijación en las fibras tanto naturales como sintéticas y por lo tanto es necesario incluir un proceso de fijación ocasionando problemas de contaminación de mantos acuíferos así como de atender contra la salud del mismo hombre, (André B. dos Santos *et al.*, 2007).

El aislamiento de microorganismos productores de pigmentos permitirá obtener un consorcio de microorganismos para seleccionar los pigmentos naturales que no sean tóxicos para el hombre ni para el medio ambiente.

PARTE EXPERIMENTAL**Muestreo**

Se muestrearon 8 localidades de los estados de Tlaxcala, Puebla, Hidalgo, Oaxaca, Veracruz, las cuales cuentan con climas tales como, Tropical-lluviosa, Templado-lluvioso y seco.

La toma de muestra de suelo, se realizó por la técnica de hoyo barrenado, se excava un hoyo de aproximadamente 30 cm., se toma la muestra, 500 grs. aproximadamente de suelo y se coloca en bolsas estériles, están son etiquetadas con los datos del lugar, selladas herméticamente y refrigeradas. (Se guardan en refrigeración para conservar la carga microbiana).

Selección de medios de cultivo

Se probaron 6 diferentes medios de cultivo los cuales fueron, 1F, YCED, Medio mínimo, Caldo nutritivo, R₂YE, PDA, también se probaron diferentes fases de medio de cultivo como fueron, sólidos y líquidos a diferentes pH 5.5, 6.5, 7.2.

Aislamiento de actinomicetos

Se tomaron 500grs. de suelo y agregaron 500 ml. de agua destilada y estéril, se agito perfectamente, posteriormente se realizaron diluciones con el sobrenadante para inocular en placa con los diferentes medios de cultivo mencionados anteriormente y se incubaron a diferentes temperaturas las cuales fueron 30°C, 37°C y 45°C.

Una vez identificado el crecimiento de algunas colonias de actinomicetos se realizó la purificación de los mismos.

Purificación de actinomicetos

Para la purificación de actinomicetos se tomó una muestra de la colonia aislada y se inoculo el medio donde desarrollo esporas, con la técnica de aislamiento por estría y se incubaron a diferentes temperaturas, posteriormente de una colonia pura se realizó una siembra por estriado cerrado las cuales se recolectaron y guardaron en viales en glicerol al 30 % y se ultra congelaron a -70°.

Selección de actinomicetos productores de pigmentos

Se realizó la selección de las cepas bacterianas a partir de la producción de un metabolitos secundarios (pigmento), esta selección fue de manera visual, por cambios de color del medio de cultivo.

Extracción de pigmentos

La extracción se realizó a partir de concentración bacteriana, la cual fue sometida a diferentes procesos de molienda, con la finalidad de romper la pared celular y extraer el pigmento. Los procesos de ruptura celular fue con las siguientes herramientas: a) mortero y pistilo b) proceso de molienda por licuación.

Posteriormente se sometió a un choque térmico (agitación y calentamiento en baño maría), esto se filtró para separar las fases sólido y líquido.

Con la fase líquida se aplicaron diferentes solventes los cuales fueron: Agua, alcohol acetona y éter de petróleo a una dilución de 2:1 (2 partes solvente y 1 parte muestra bacteriana)

RESULTADOS

Se obtuvieron 17 cepas de actinomicetos de las diferentes localidades que fueron muestreadas, de las cuales 10 producen un metabolito secundario que tiñe el medio de cultivo.

Obteniendo la mayoría de las cepas de las localidades muestreadas en el estado de Hidalgo las cuales cuentan con clima Templado lluvioso.

La tabla 1, muestra las cepas obtenidas, el medio cultivo y la temperatura de incubación correspondiente a cada una de las cepas.

Tabla 1. Cepas seleccionadas productoras de pigmento.

Cepa	medio	T°
h 7	1F	30°
h51	1F	30°
h5	1F	30°
rt	1F	30°
h23	1F	37°
hp1	1F	37°
h21	1F	37°
h1a	1F	37°
h1c	1F	37°
h22	1F	37°
e261	1F	45°
e2c	1F	45°
zap2	1F	45°
e16	1F	45°
010	1F	45°
h533a	1F	37°
h533b	1F	37°

La tabla 2, muestra el color en que las cepas seleccionadas tiñen el agar. Se observa que en el clima templado lluvioso es donde mayor cantidad de cepas bacterianas se obtuvieron.

Tabla 2. Producción de pigmento.

Cepas	Color
h 7	Amarillo
h51	Amarillo
h5	Café
Rt	Café
h23	Negro
hp1	Café
h21	Café
h1a	Negro
h1c	Negro
h22	Negro

Las cepas que mayor cantidad de UFC presento fueron la h7 y hp1 con se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Cuantificación de UFC de las cepas productoras de pigmento.

Cepa	UFC
h 7	141x10 ¹¹ /ml
h51	38x10 ¹¹ /ml
h5	96x10 ¹¹ /ml
Rt	35x10 ¹¹ /ml
h23	43x10 ¹¹ /ml
hp1	105x10 ¹¹ /ml
h21	58x10 ¹¹ /ml
h1a	34x10 ¹¹ /ml
h1c	31x10 ¹¹ /ml
h22	28x10 ¹¹ /ml

La tabla 4, muestra las cepas, el peso extraído de pigmento con diferentes solvente como alcohol, agua, acetona y éter de petróleo.

Tabla 4. Solventes utilizados para extracción de pigmentos.

Cepa	OH ⁻	H ₂ O	acetona	éter
h 7	0.0178gr	0.0138gr		
h51	0.0055gr	0.0053gr		
h5	0.0065gr	0.0008gr		
Rt	0.0040gr	0.0010gr		
h23	0.0446gr	0.0223gr	0.0033g	-----
hp1	0.0042gr	0.0034gr		
h21	0.0054gr	0.043gr		
h1a	0.0062gr	0.0013gr		
h1c	0.0085gr	0.0030gr		
h22	0.0022gr	0.0022gr		

Con éter de petróleo y acetona solo se realizó una prueba con las mejores cepas (h7 y h23), para realizar una comparación con el peso extraído de pigmentos con los solventes antes mencionados (agua y alcohol).

La temperatura de extracción de pigmentos fue a los 75°C, con los 4 solventes.

CONCLUSIONES

El pH del medio de cultivo se determinó de acuerdo al pH de las muestras de suelo, y se estandarizo en pH 7.2 donde los actinomicetos presentaron un óptimo desarrollo y esporulación, sin embargo cepas como la h23 también presenta desarrollo y esporulación en un pH 5.5.

La temperatura de extracción fue de 75°C, ya que la temperatura de extracción debe estar entre 50 y 100° C, como lo menciona SEMARNAT y UBC en el 2003, ya que a mayor temperatura aumenta la velocidad de extracción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blanc, P. J., Loret, M.O., Santerre, A. L., Pareilleux, A., Prome, D., (1994). Pigments of *Monascus*. *Journal of Foot Science* 59 (4), 862-865.
2. Caron, F., Borsa-Lebas, F., Boiron, P., Vasseur, E., Hennequin, C., Dauga, C., Lemeland, J. F. and Humbert, G. 1992., *Streptomyces* sp. as a cause of nodular pneumonia in an HIV infected patients?. *Med. Microbiol. Lett.* 1: 297-303,

3. Carvalho, J. C., Pandey, A., Babitha, S. and Soceol C. R., 2003, Production of *Monascus* biopigments: An overview Agro FOOD industry hi-tech 6, 37-42.
4. Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. N., Song, C. H., and Yun, J. W., (2002a). Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigments production by *Paecilomyces sinclairii* in batch bioreactor. *Journal of biotechnology* 000, 1-11.
5. Durán, N.Teixeira M. F. S.; de Conti, R. and espósito, E. (2002) Ecological-friendly Pigments From Fungi *Cristical Reviews in Food Science and Nutrition* 42 (1), 53-66.
6. Dworkin M., 1996, Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological Reviews* 60: 70-102,
7. Fleno, B. *et al*; Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use, US 5.356.810 (1994).
8. Hidrin, N, Goodfellow, M, Boiron, P *et al*. 2001, Los estreptomicos: Actualización y revisión didáctica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, ene., vol.21, no.1, p.36-38. ISSN 1315-2556.
9. Hui, H.N.; Guo-Quing, R.; Hui, Chen Qi-Be; Feng, C. 2005 . Aplicacion of derivate ratio spectrophotometry for determination of B-carotene and Astaxanthin
10. Jaramillo Moreno, C. A. y Muñoz Moreno, O. A. 1992, Extracción de colorante de Achiote. Medellín. Universidad Nacional. Facultad Nacional de Minas. Departamento de Procesos Químicos.
11. Phaff H.J. 1981, Microorganismos industriales. *Investigación y Ciencia* 62: 22-37.
12. SEMARNAT. Secretaria del medio ambiente y recursos naturales. (2003). Especies con Usos no Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino [online]. México. Colorantes y Taninos.
13. UBC. University of British Columbia. (2003). Faculty of Agricultural Sciences. Chemistry Of Food Systems [online]. Vancouver (BC).
14. Wang F, Couture R, Do CB, Pham TQ, Tong VH. 1997, Properties of anthocyanins from grape cell culture. *J Food Sci* 62(2):246-248.
15. Wani, K. S., Naphada B. S., Chaudhari, B. L. and Chincholkar, S. B., 2004, Pigmet Production in concise encyclopedia of Bioresource Thechnology. AshokPandey, PhD. The Haworth Refence Press.

ANÁLISIS FISIOLÓGICO DE CEPAS SILVESTRES DEL GÉNERO *Trichoderma*

Karla Ivonne González Martínez^{1,3}, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^{2,3} y Gerardo Vázquez-Marrufo^{1,3}

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. ²División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". ³Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. e-mail:

gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

Las especies del género fúngico *Trichoderma* son utilizadas como agentes de control biológico contra plagas que dañan cultivos de relevancia agrícola. La selección de una cepa de *Trichoderma* spp. con potencial para el biocontrol requiere del conocimiento básico sobre su fisiología, particularmente en condiciones ambientales extremas. En el presente trabajo se analizó el crecimiento, la conidiación y la germinación conidial de una cepa de las especies *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. viride*, *T. tomentosum*, *T. koningii* y *T. viridialbum*, así como tres cepas de *T. harzianum*, incubadas en agar dextrosa papa (PDA) y agar extracto de malta (AEM), en diferentes temperaturas y valores de pH. Todas las cepas mostraron desarrollo de micelio entre 16 y 32 °C, con un óptimo a 20 °C. A excepción de *T. koningii* y una cepa de *T. harzianum* (CMU-51), las cepas inhibieron significativamente su crecimiento a 36 °C, particularmente en AEM. La cepa de *T. gamsii* conidió entre los 16 y los 36 °C, siendo 16 °C la temperatura óptima para la mayoría de las cepas. Ninguna de las cepas mostró diferencias significativas en el crecimiento micelial a pH de 4, 7 y 9, en ambos medios de cultivo. *T. tomentosum* no conidió en ningún valor de pH, y el resto de lo hicieron de manera óptima a pH de 4. Una cepa de *T. harzianum* (CMU-181) no conidió en ninguna condición de cultivo. Las conidias de una cepa de *T. harzianum* (CMU-51) y *T. gamsii* germinaron eficientemente en las temperaturas extremas de 16 y 36 °C, y el resto de cepas que conidieron germinaron con distinto nivel de eficiencia a 16 y 28 °C. Se encontró una gran variación fisiológica entre las cepas de estudio, siendo la cepa CMU-51 de *T. harzianum* la que mostró una mayor versatilidad en crecimiento, conidiación y germinación.

INTRODUCCIÓN

El control biológico o biocontrol se considera como una alternativa para combatir a microorganismos fitopatógenos, mediante el incremento de la presencia de organismos que logran desarrollar mecanismos de defensa y/o competencia contra éstos patógenos, además de ser una alternativa en el uso de sustancias químicas usadas en la agricultura (4). Las especies del género de hongos *Trichoderma* spp, son uno de los microorganismos más ampliamente estudiados y empleados en relación al biocontrol; estos hongos llegan a habitar naturalmente un importante número de ecosistemas terrestres (1) (2). El éxito actual de diversas especies de *Trichoderma* como agentes biocontroladores se debe a las características que presenta, tales como su amplia distribución geográfica que le permite desarrollarse en muy diversas condiciones climáticas en diferentes compartimentos de los ecosistemas; la competencia por nutrientes y espacio contra otros microorganismos, además de poseer una alta versatilidad en requerimientos nutrimentales ya que son capaces de asimilar sustratos complejos como la celulosa y usarlos para su crecimiento gracias a su capacidad para producir gran diversidad de enzimas hidrolíticas extracelulares. Una de las características más importante es su gran capacidad de adaptación para desarrollarse vegetativamente en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad, pudiendo crecer en ambientes poco favorables para otros microorganismos. (1)(2)(17)(7).

Considerando lo anterior en este trabajo se evaluaron nueve cepas silvestres de *Trichoderma* spp. aisladas de diferentes ecosistemas del estado de Michoacán, caracterizando las condiciones óptimas de crecimiento, producción y germinación de conidias con la finalidad de generar conocimiento que permita identificar aquellas cepas con mayor potencial biotecnológico.

TEORÍA

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez en 1794 por Persoon (14). Posteriormente Rifai en 1969, hizo el primer agrupamiento en agregados de especies que en términos generales todavía es utilizado, actualmente se han descrito 254 especies y dos variedades dentro de dicho género (3). El estado vegetativo de las especies del género *Trichoderma* presenta micelio haploide con septos simples. Se reproducen asexualmente por conidios que miden de 3 a 5 μm de diámetro, los cuales generalmente son unicelulares de forma ovoide y con coloración verde; presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos. Tienen la capacidad de formar clamidosporas, de forma redonda o elipsoidales, incoloras, amarillentas o verdosas y de 6-15 μm de diámetro (10), (12). La mayoría de las especies del género son aeróbicas, con una gran versatilidad para utilizar fuentes de carbono y nitrógeno. En relación al entorno fisicoquímico, el crecimiento vegetativo es más afín a una alta humedad y temperaturas entre los 15 y 30 °C. Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, en donde el crecimiento óptimo va de los 20 y 28 °C; mientras que respecto al pH pueden crecer en entornos entre 2 a 6, teniendo como condición óptima un pH de 4 (8)(9).

La esporulación asexual de *Trichoderma* spp. depende primordialmente del tipo y la disponibilidad de la fuente de carbono (6) y llega a ser modulada por parámetros tales como la iluminación, la privación de nutrientes, un pH bajo y el daño mecánico (18) (16) (5).

Mientras que en relación a los aspectos nutricionales estos hongos crecen bien en medios completos como lo son el agar dextrosa papa (PDA) y el agar extracto de malta (AEM), quienes cumplen los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo micelial, como para los procesos de reproducción, incluida la conidiación asexual, ya que contienen en concentraciones milimolares los macronutrientes necesarios los incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno azufre, fósforo, K y Mg; los micronutrientes proporcionados en concentraciones micromolares incluyen comúnmente cationes metálicos como Ca, Cu, Fe, Mn y Zn, principalmente (19).

Encontrar una cepa de *Trichoderma* spp. que sea un buen agente biocontrolador para su aplicación en campo implica diversos retos que incluyen el asegurar que sea de fácil propagación y que la producción de conidias, quienes las conidias representan la principal estructura biológica para la producción comercial de productos de biocontrol, sea económicamente rentable; además la biotecnología busca el desarrollo de formulaciones con mayor vida de anaquel y mejor persistencia en el campo (13)(15)(1)(11), por lo que las cepas silvestres de este género representan una alternativa potencial para el desarrollo de productos agrícolas.

PARTE EXPERIMENTAL

Se analizó el crecimiento micelial y la producción de conidias, de nueve cepas silvestres de *Trichoderma* spp. (Tabla 1) realizando cinéticas de crecimiento en los medios completos AEM y PDA, incubando a 16, 20, 32 y 36 °C; realizando mediciones cada 24 horas, durante 10 días. También se analizó el crecimiento y conidiación en medio PDA ajustando el pH a 4, 7 y 9; incubando a 28 °C. Se realizaron mediciones cada 24 horas, durante 10 días. Todas las cinéticas se realizaron por triplicado.

Para los ensayos de germinación de conidias, primeramente se cosecharon las conidias de aquellas cepas que presentaron conidiación constante para posteriormente sembrar 30 conidias en placas Petri de medio PDA, esparciéndolas de manera homogénea. Los medios así inoculados se incubaron a 16°C, 28°C y 36°C. Se registró el tiempo en que se observaron colonias incipientes, indicando la germinación y se contó el número de colonias observado. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Datos de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp.

CEPA	ESPECIE	LOCALIDAD DE COLECTA	TIPO DE VEGETACIÓN
CMU-8	<i>H. atroviridis/T. atroviride</i>	Parque Nacional "José Ma. Morelos", Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-21	<i>T. gamsii</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-51	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Pátzcuaro	Bosque Pino-Encino
CMU-181	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-183	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-218	<i>H. rufa/T. viride</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-222	<i>T. tomentosum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-234	<i>H. koningii/T. koningii</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-236	<i>T. viridialbum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino

RESULTADOS

Se observó que todas las cepas mostraron desarrollo de micelio en los dos medios de cultivo y entre 16 y 32 °C (Figura 2), teniendo como óptimo a 20 °C; a excepción de *T. koningii* y una cepa de *T. harzianum* (CMU-51) las cepas inhibieron significativamente su crecimiento a 36 °C, particularmente en AEM (Figura 3), inclusive esta última temperatura llegó a inhibir totalmente el crecimiento en dos cepas. En aspectos de conidiación la temperatura de 16 °C presentó los mejores niveles de conidiación seguida de 28 °C, afectándose este proceso significativamente a 36 °C para la mayoría de las cepas, a excepción de CMU-21, CMU-51 y CMU-218, que conidieron en las cuatro temperaturas evaluadas.

Las cinéticas de crecimiento micelial realizadas en medio PDA a un pH de 4, 7 y 9, no mostraron diferencias significativas (Figura 4), entretanto la producción de conidias fue óptima a una condición de pH 4 para la mayoría de las cepas. La cepa CMU-222 de *T. tomentosum* no conidió en ningún valor de pH.

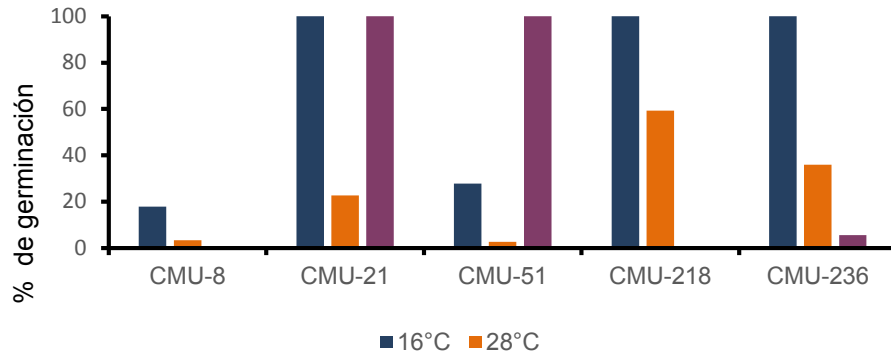


Figura 1. Capacidad de germinación de las cepas de *Trichoderma* spp. de estudio. Se inocularon 30 conidias en placas Petri con medio PDA, incubando a las temperaturas indicadas. Las placas se revisaron a las 12, 18 y 24 horas para poder realizar el conteo de las conidias que germinaron. Los datos graficados corresponden a los reportados a 24 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los ensayos de germinación mostraron que las conidias de una cepa de *T. harzianum* (CMU-51) y *T. gamsii* (CMU-21) germinaron eficientemente en las temperaturas extremas de 16 y 36 °C. El resto de cepas que conidieron germinaron con distinto nivel de eficiencia a 16 y 28 °C, siendo la cepa CMU-8 la que presentó los porcentajes más bajos de germinación a estas dos temperaturas (Figura1).

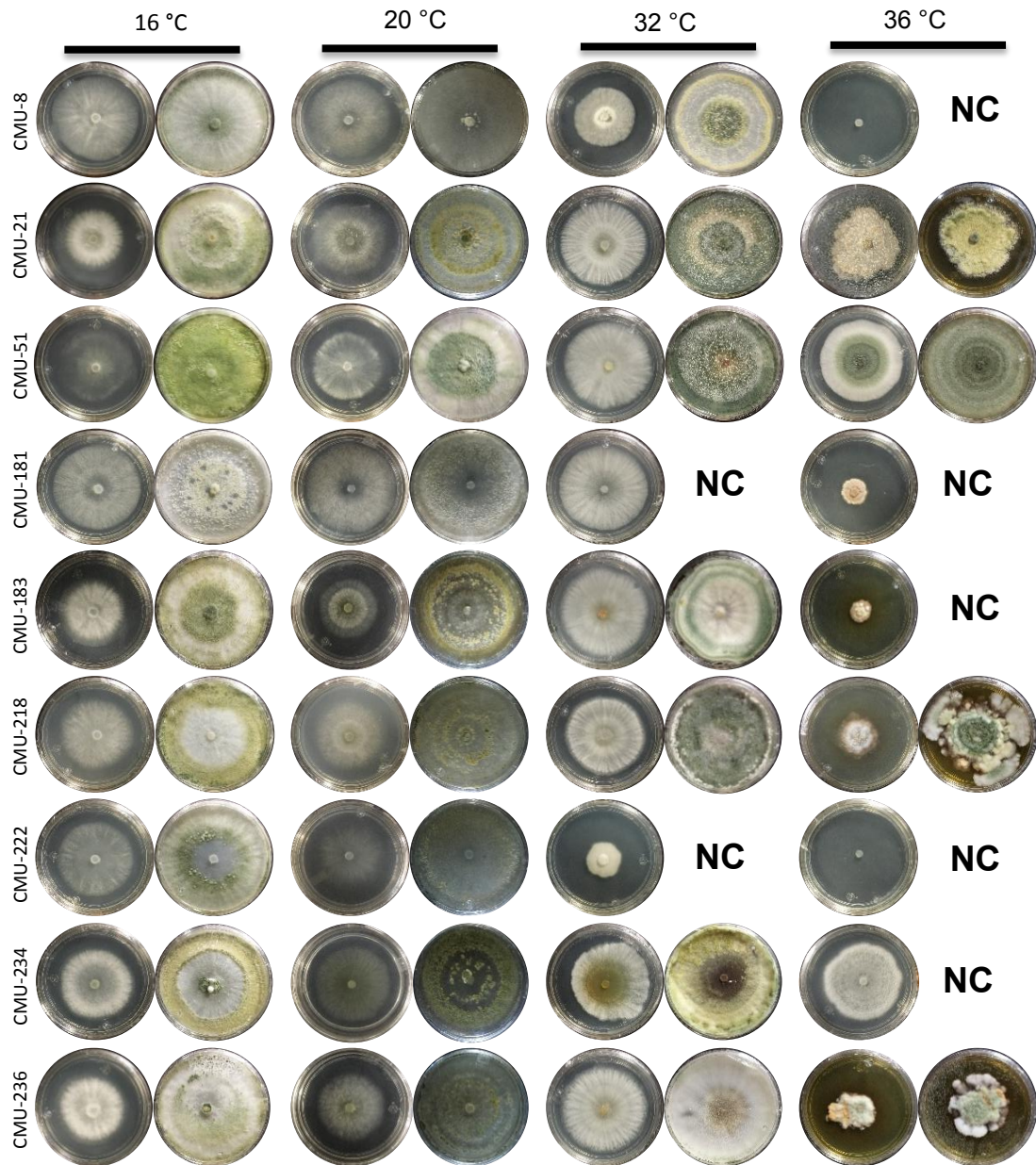


Figura 2. Desarrollo micelial y conidiación de las cepas de estudio en medio PDA. El código de cada cepa aparece del lado izquierdo, y la temperatura de incubación se especifica en la parte superior. En cada temperatura se muestra para todas las cepas el aspecto de la colonia en la fase logarítmica media (columna de la izquierda) y la conidiación (columna de la derecha). NC, la cepa no conidió.

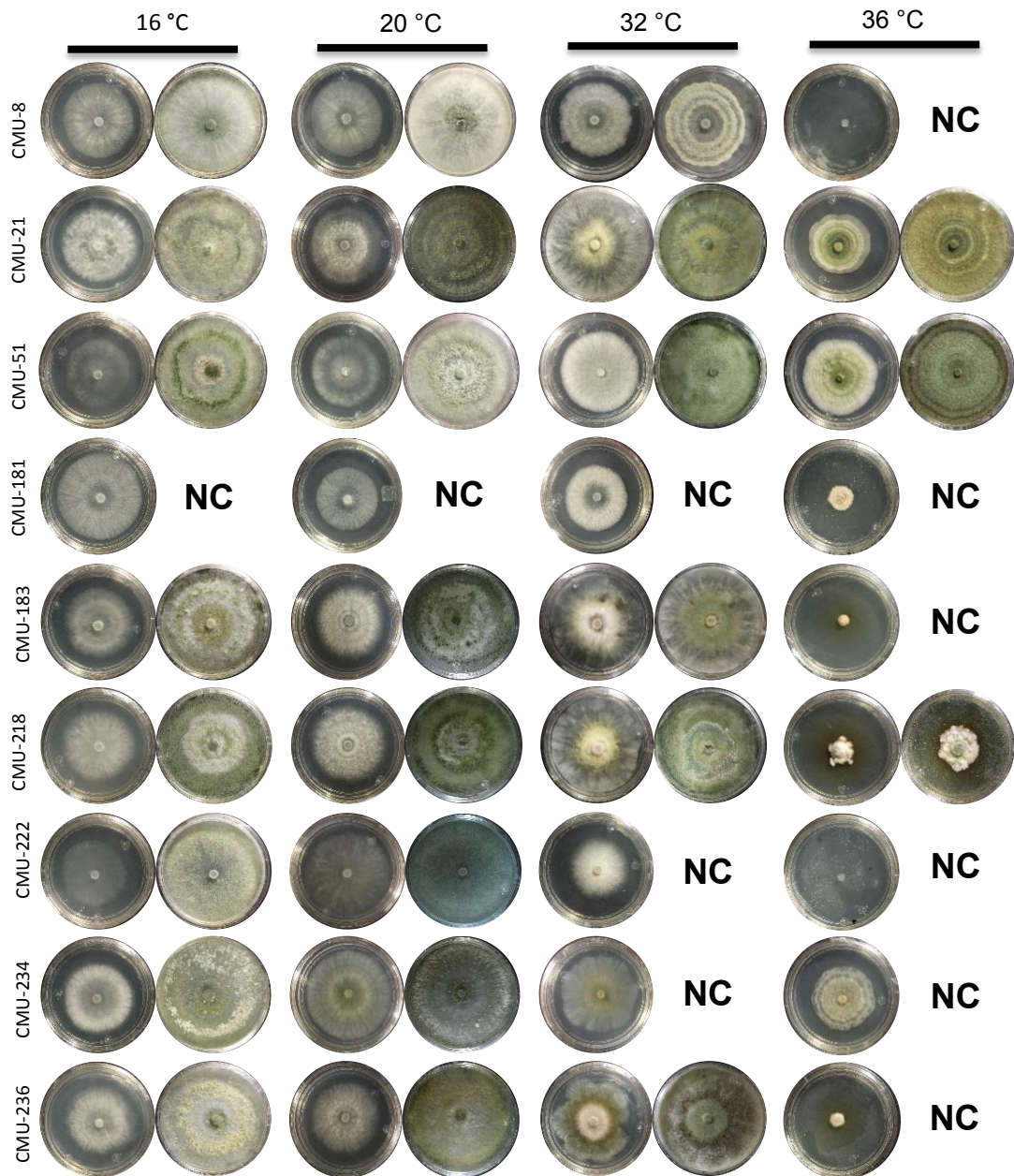


Figura 3. Desarrollo micelial y conidiación de las cepas de estudio en medio AEM. El código de cada cepa aparece del lado izquierdo, y la temperatura de incubación se especifica en la parte superior. En cada temperatura se muestra para todas las cepas el aspecto de la colonia en la fase logarítmica media (columna de la izquierda) y la conidiación (columna de la derecha). NC, la cepa no conidió.

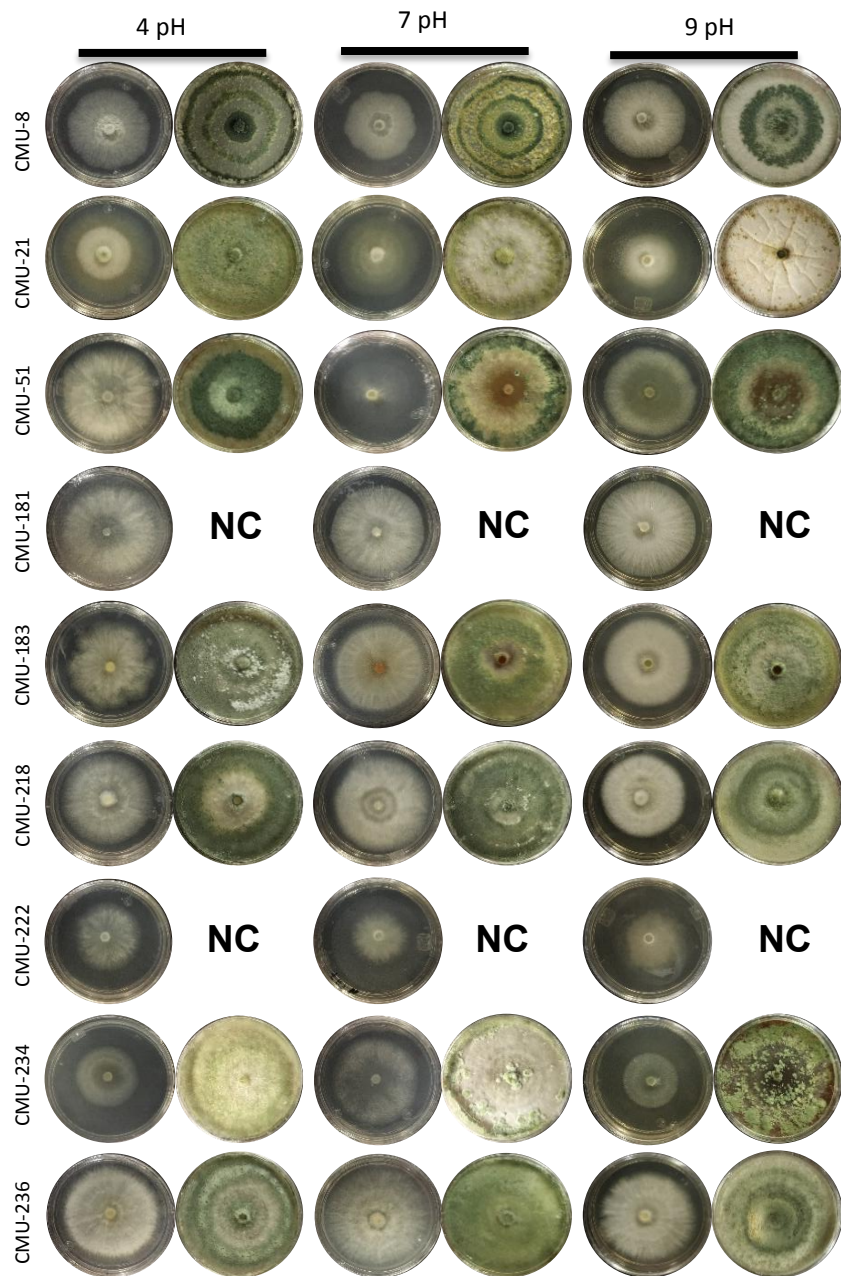


Figura 4. Cinéticas de crecimiento en medio PDA con distinto pH. El código de cepa aparece del lado izquierdo, y el pH del medio se especifica en la parte superior. En cada condición se muestra para todas las cepas el aspecto de la colonia en la fase logarítmica media (columna de la izquierda) y la conidiación (columna de la derecha). NC, la cepa no conidió. Los ensayos se incubaron a 28 °C y se realizaron por triplicado.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Trichoderma* spp. estudiadas presentan variaciones fisiológicas significativas en relación al crecimiento micelial, la conidiación y la germinación en las condiciones experimentales evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agamez-Ramos, E.Y., Zapata-Navarro R.I., Oviedo-Zumaqué L.E., Barrera Violeth J.L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(2): 23-34.
2. Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Peña-Cabriales, J.J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25(4): 257-269.
3. Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., Samuels, G.J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*. 6(2): 263-295.
4. Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol 1. *Annal. Review. Phytopathology*. 43: 337-359.
5. Friedl, M.A., Kubicek, C.P., Druzhinina I.S. (2008). Carbon source dependence of conidiation and its photostimulation in *Hypocrea atroviridis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 245-250.
6. Harman, G.E. (2011). *Trichoderma* not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*. 39(2): 103-108.
7. Jackson, A.M., Whipps, J.M., Lynch, J.M. (1991). Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 7:494-501.
8. Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*. 41(1): 37-42.
9. Kubicek, C.P., Harman, G.E. (1998). *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor and Francis Ltd. 1: 6-7
10. Li, Y.Q., Song, K., Li, Y.C., Chen, J. (2016). Statistical culture-based strategies to enhance chlamydospore production by *Trichoderma harzianum* SH2303 in liquid fermentation. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 17(8): 619-627.
11. Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*. 28(1):1-11.
12. Paulitz, T.C., Belanger, R.R. (2001). Biological control in greenhouse systems, *Annual Review of Phytopathology*. 39:103-133.
13. Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 96(2): 195-206.
14. Sánchez, E.T., Cota, H.C. (2006). Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas. Disponible en: http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe_2006/1038967/21_c17.pdf
15. Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, E.U., Herrera-Estrella, A. (2010). *Trichoderma* in the light of day—physiology and development. *Fungal Genetics and Biology*. 47(11): 909-916.
16. Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3): 787-799.
17. Steyaert, J.M., Weld, R.J., Mendoza-Mendoza A., Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*. 156: 2887-2900.
18. Walker, G. M. and White, N. A. (2011). Introduction to fungal physiology. In *Fungi: Biology and Applications*, Second Edition. Edited by Kevin Kavanagh. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 1-35.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DEL CACAO (*Theobroma cacao*)

Rosa Laura Rebolledo García, Patricia Aguilar Sánchez y Casimiro Ordóñez Prado

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias

RESUMEN

El cacao tiene su origen en la cuenca del Amazonas, su cultivo se inició en México desde la época de los Olmecas y actualmente es empleado a nivel mundial en el sector industrial alimenticio. En México se producen 26863 t de fruto al año, que se emplean en la industria chocolatera, la cual reporta un rendimiento del 42 % de la materia prima, resultando en acumulación anual de 11282 t de residuos de mazorca del cacao. La gran generación de residuos de la agroindustria ha generado que se investiguen usos alternos para la obtención de nuevos productos de interés comercial. El primer paso para identificar estos subproductos potenciales es la caracterización de la materia residual, por lo que el objetivo del trabajo fue caracterizar químicamente los residuos agroindustriales de cacao. Se tomaron muestras de residuos la industria chocolatera en el estado de Tabasco, con la que se formó una muestra compuesta que se secó, molió y tamizó. Posteriormente, a una submuestra se le eliminaron los extractivos, y esta fue empleada para la determinación del contenido de celulosa, lignina y cenizas. También se determinaron el poder calorífico a otra submuestra con extractivos y se hidrolizó otra parte para la determinación de un perfil de carbohidratos por medio de HPLC. Las características químicas del cacao fueron semejantes a los de los residuos forestales, con un poder calorífico de 4509.0538 Cal g⁻¹, sobresaliendo el contenido de glucosa con un 38.9 % después del proceso de hidrólisis. Los residuos de cacao tienen potencial como materia prima para la obtención de otros subproductos.

INTRODUCCIÓN

El cacao es un fruto de gran importancia económica y cultural. Considerado de origen divino por las culturas prehispánicas (Waizel-Haiat *et al.*, 2012); actualmente, por la diversidad genética encontrada, se cree que su origen se encuentra en la cuenca de las amazonas comprendida entre Perú, Colombia y Ecuador (Romero *et al.*, 2010). A nivel internacional, en 2016 existen 59 países productores de este fruto, que en conjunto destinan 10.1 millones de hectáreas a este cultivo para obtener 4.4 millones de toneladas de cacao (FAOSTAT, 2018). En México el cacao se cultiva en Tabasco, Chiapas y Guerrero, produciendo en promedio 27 mil toneladas anuales de este fruto, generando una derrama económica de 1,051 millones de pesos mexicanos (SIAP, 2017).

En México se produjeron en 2006, 75.73 millones de toneladas de materia seca provenientes de 20 cultivos, de los cuales 15.60 millones de toneladas corresponden a los residuos postcosecha como bagazo de caña de azúcar, mazorcas, olotes, bagazo de maguey y pulpa de café (Valdez-Vázquez *et al.*, 2010). El fruto de cacao, también conocido como mazorca, después de cosechado, debe ser cortado y dividido para exponer los granos y extraerlos (Afoakwa, 2010), dejando el pericarpio o cáscara como residuo. La cáscara del cacao representa entre el 52 y el 76 % del peso total de la mazorca (Chan y Choo, 2013). Lo que implica la generación de una gran cantidad de residuos y representa un serio problema para su disposición (Chan y Choo, 2013), además, de que sirven como reservorios de agentes patógenos del cultivo como *Phytophthora* y *Oomycetes* (Mendoza-Vargas *et al.*, 2017; Jaimes-Suárez y Aranzazu-Hernández, 2010) y generan un impacto negativo al ambiente. Derivado de esta situación, se han realizado investigaciones para darle utilidad a esta materia. Dentro de las opciones que se han explorado se encuentra su uso como fuente renovable de energía (Syamsiro *et al.*, 2012), agente biorremediador (Okoya *et al.*, 2014), además de que es fuente de lipasas y pectinas, materias primas en la industria alimenticia (Mendoza-Vargas *et al.*, 2017; Barazarte *et al.*, 2008). En México, para poder determinar su uso potencial en diferentes áreas primero se tiene que contar con la caracterización química de los residuos agroindustriales de cacao.

TEORÍA

Los residuos agroindustriales son materiales que se generan a partir del consumo directo o la industrialización de productos primarios y son susceptibles de aprovecharse o transformarse para generar otro producto con valor económico. Para determinar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos es necesaria su caracterización para conocer su composición (Saval, 2012). Estos residuos se caracterizan por contener materia orgánica constituida principalmente por lignocelulosa (Saval, 2012) que es el principal componente de la biomasa fotosintética. La lignocelulosa se encuentra en la pared celular vegetal y se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina (Cuervo et al., 2009; Valenciaga y Chongo, 2004, García *et al.*, 2002).

Se han definido criterios para seleccionar los residuos con potencial para su aprovechamiento biotecnológico. Uno de ellos es que el componente químico principal pueda ser utilizado para la producción de insumos industriales o que pueda ser sometido a una extracción para recuperar uno de sus componentes con demanda en el mercado (Saval, 2012).

La celulosa es un polímero de forma general $(C_6H_{10}O_5)_n$ constituido por unidades lineales de glucosa (Valenciaga y Chongo, 2004) y es el componente principal de las paredes de las células vegetales, donde se encuentra asociada a la hemicelulosa, pectina y lignina (Matos-Chamorro y Chambilla-Mamani, 2010). Las hemicelulosas son carbohidratos estructurales no celulósicos que existen como polímeros lineales y ramificados, en asociación con otros carbohidratos. Está constituida por pentosas y hexosas: la xilosa, manosa y galactosa, frecuentemente forman su estructura vertebral, mientras que la arabinosa, galactosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico están presentes en los lados de la cadena (Matos-Chamorro y Chambilla-Mamani, 2010; Valenciaga y Chongo, 2004). La lignina comprende un grupo de compuestos polifenólicos de diversos pesos moleculares y contribuye a la rigidez de la pared celular de las plantas (García et al., 2002) constituye el principal polímero natural junto con la celulosa y es responsable de la resistencia de los tejidos vasculares, la conducción de solutos, agua y sales minerales necesarias para la supervivencia de la planta, además de la protección contra fenómenos oxidativos y de ataques de parásitos (Valenciaga y Chongo, 2004). Cuando el material lignocelulósico se somete a un proceso de hidrólisis, la estructura química se fracciona en las unidades que los componen, como los carbohidratos, que tienen en muchas ocasiones usos industriales. La glucosa se usa principalmente en la industria alimentaria como edulcorante en la fabricación de caramelos, sustrato en procesos fermentativos y sustrato para la obtención de sorbitol. La galactosa es uno de los disacáridos estructurales de la lactosa, además es un precursor de agentes estabilizantes y espesantes usados en la industria de alimentos (Olivia *et al.*, 2010, Primo, 1995). Por otra parte, la arabinosa se emplea en la industria como sustrato para la obtención de azúcares raros como la ribulosa y la ribosa, las cuales cuentan con un excelente valor comercial en la industria de alimentos (Xu *et al.*, 2014; Helanto *et al.*, 2009).

La información sobre la composición química de los residuos de cacao es escasa, Daud *et al.* (2013) determinaron en Malasia la morfología y composición química de las cáscaras de cacao para emplearse en la industria del papel. En Ghana, Donkho *et al.* (1991), analizaron la composición química de la cáscara del híbrido Amelonado y su efecto en el crecimiento y la eficiencia alimentaria en pollos de engorda,

Sin embargo, la información generada fue con híbridos o variedades de otros países, además, deja de lado algunos compuestos que pueden ser usados como insumos en otros sectores industriales. Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue caracterizar químicamente los residuos agroindustriales de cacao.

PARTE EXPERIMENTAL

El principal estado productor de cacao en México es Tabasco. En el presente estudio se colectaron muestras de cáscara de cacao como residuo agroindustrial de la industria chocolatera del estado de Tabasco. El primer paso en el proceso fue el cortar la cáscara en pedazos pequeños y meterla a una estufa a desecarse a 50 °C hasta obtener una humedad aproximada al 10 %. Después las muestras se prepararon de acuerdo con lo establecido en la norma TAPPI 257 cm-85 "Sampling and Preparing Wood for Analysis", que consiste en moler, tamizar y secar las muestras.

Las variables determinadas al residuo de cacao fueron: contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, cenizas, poder calorífico y contenido de glucosa, galactosa y arabinosa. Las determinaciones se hicieron por triplicado, la media de las tres repeticiones se presentan como resultados.

Para la determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina, se eliminaron primero los extractivos de los residuos, para lo que se secaron en horno a 103 °C, posteriormente se sometieron ocho gramos a una extracción secuencial etanol-benceno y etanol con un sistema de extracción Soxhlet. La muestra que se extrajo se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 500 mL de agua hirviendo. El matraz se colocó en baño de agua, manteniéndolo a ebullición por una hora. Para finalizar se filtró al vacío con embudo Büchner y se dejó secar a temperatura ambiente, el sólido filtrado se consideró libre de extractos.

En lo que respecta a celulosa, se pusieron en un matraz Erlenmeyer 2.5 g de materia libre de extractos secada al horno con 80 mL de agua caliente, 0.5 mL de ácido acético y 1 g de clorito de sodio. El matraz se tapó con un vidrio de reloj y se puso en baño de agua por una hora manteniéndolo a 75 °C. Después se agregaron 0.5 mL de ácido acético y 1 g de clorito de sodio. Este procedimiento se repitió cada hora, por un lapso de 4 h. Al término, se pasó el matraz a un baño con hielo y se filtró la solución en un crisol Gooch, previamente pesado. El residuo se lavó con 120 mL de agua destilada, 80 mL de etanol y 150 mL de acetona. A continuación, el crisol se colocó en un horno a 105 °C hasta peso constante y por gravimetría se sacó el rendimiento de lo que es la holocelulosa. Se tomaron dos gramos de este material seco y se colocaron en un vaso de precipitado con 10 mL de NaOH al 17.5 %, se agitó y cubrió con un vidrio de reloj y se colocó en baño de agua a 20 °C. Cada 5 minutos se agregaron 5 mL del hidróxido hasta completar 25 mL y se dejó reposar por 30 min. Al pasar este tiempo se agregaron 33 mL de agua y mezcló, para dejar reposar por 1 h. Se filtró al vacío con un embudo Gooch seco y previamente pesado; durante el proceso de filtrado, se lavó el espécimen y el vaso de precipitado con 100 mL de NaOH al 8.5 % y agua destilada, al finalizar estos lavados se agregaron 15 mL de ácido acético al 10 %, se suspendió la succión al vacío por 3 minutos para reanudarse de nuevo y seguir con un lavado con agua hasta pH neutro. La cantidad de celulosa se determinó por gravimetría al secar el crisol en un horno a 105 °C hasta peso constante, el contenido se determinó al relacionar la cantidad de residuo empleado con la celulosa obtenida.

El contenido de hemicelulosa se presenta como el valor absoluto de la diferencia entre los contenidos de holocelulosa y celulosa.

La lignina se determinó al colocar en un vaso de precipitado 1 g de material libre de extractivos secados en horno con 15 mL de H₂SO₄ al 72 %, agitando de forma suave y constante durante la adición del ácido. El vaso se colocó en baño de agua a 20 °C por dos horas, con agitación cada 15 min. La solución se pasó a un matraz Erlenmeyer y se diluyó con 560 mL de agua destilada, después se calentó a reflujo durante 4 h. La solución se filtró en un crisol Gooch previamente pesado y se lavó con 100 mL de agua caliente. La cantidad de lignina se determinó por gravimetría al secar el filtrado en un horno a 105 °C. La lignina insoluble en ácido se determinó al relacionar la cantidad de residuo empleado con la lignina obtenida.

Para las cenizas, potencial calorífico y el contenido de glucosa, galactosa y arabinosa se emplearon residuos con extractivos secos en horno a 105 °C.

Las cenizas se determinaron al colocar en un crisol de porcelana seco (575 °C, 1 h) y tarado un gramo de residuo y meterlo en una mufla a 100 °C, la temperatura se aumentó gradualmente hasta los 575 °C, hasta peso constante. El crisol con el residuo se pasó a un desecador, se enfrió y pesó. El contenido de cenizas se calculó en porcentaje del material anhidro.

Las pruebas de calorimetría se basaron en las normas ASTM e711 y CEN TS 14918. Se realizaron comprimidos de los residuos con peso de 1 g, en un calorímetro con bomba Isoperibol (Parr 1266) a 30 °C. El comprimido se colocó en una cápsula seca y tarada y se pesó, después se colocó en la bomba calorimétrica de acuerdo a las instrucciones del equipo. El resultado se presenta en Cal g⁻¹.

Para la determinación de azúcares los residuos se agregaron 0.35 g de muestra, en un tubo de centrifuga, con 3 mL de H₂SO₄ al 72 % y se agitó hasta que comenzaron a disolverse. El tubo se pasó a un baño de agua a 30 °C durante 1 h, con agitación periódica. Después se transfirió a un vaso de precipitado, lavando con 84 mL de agua. El vaso se cubrió con un vidrio de reloj y se metió a la autoclave a 103 kPa de presión 1 hora. Al terminar se colocó el vaso en un baño de hielo hasta estar a temperatura ambiente. Se agregó 10 mL de indositol, se mezcló, transfirió 10 mL de la mezcla a un vaso de precipitado limpio y se añadió azul de bromofenol. Al vaso se le agregó lentamente solución saturada de hidróxido de bario, mientras se agitaba magnéticamente, hasta que la solución tomó un color violeta azulado. La solución se pasó a un tubo de centrifuga y se centrifugó hasta que el sobrenadante quedó limpio. La solución se pasó a un matraz de bola para rotavapor por

decantación. Al matraz se le agregaron 80 mg de borohidruro sódico y se mezcló, se mantuvo a temperatura durante 2 h. A continuación se agregó ácido acético glacial lentamente hasta que dejó de liberar gas. Se concentró la solución al colocar el matraz en el rotavapor en baño de agua a 35 °C. Posteriormente hicieron dos lavados con 10 mL de metanol, el cual se mezcló y evaporó hasta quedar seco. El matraz se metió a un horno a 105 °C por 15 min. Al residuo ya seco se agregaron 7.5 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de ácido sulfúrico y se mezcló. El matraz se puso en baño María a 50 °C por una hora, se sacó y dejó enfriar por 5 minutos. El contenido del matraz se pasó a un vaso con 70 mL de agua helada en agitación. Después la mezcla se colocó en un embudo de decantación y se extrajeron porciones de 25, 15 y 10 mL de cloruro de metileno, se juntaron y se concentraron a sequedad con baño de agua a 75 °C. A continuación se les agregaron a los residuos 1 mL de agua y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en 2 mL de cloruro de metileno, formando nuestra solución de acetatos de alditol. Se inyectaron 0.5 mL de la solución mencionada a viales de HPLC usando jeringas con microfiltros. El equipo se programó y dejó trabajar. Para finalizar, se registraron los datos arrojados por el equipo. Estos sirvieron para calcular el porcentaje de cada carbohidrato con la Ecuación 1.

Ecuación 1. Cálculo para determinar el porcentaje de carbohidratos por muestra.

$$\text{Porcentaje} = \frac{A * W_1 * C * 100}{A_1 * W * k}$$

Donde A es el área del pico de cada carbohidrato; A₁ es el área del pico del estándar interno, W₁ el peso en mg del estándar interno (100 mg); W es el peso seco de la muestra, C es el factor de conversión (0.88 para pentosas y 0.90 para hexosas) y k el factor de calibración de cada carbohidrato.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran las características del residuo agroindustrial del cacao, resultante de este trabajo.

La celulosa encontrada en este trabajo es superior a lo reportado por Daud *et al.* (2013) quienes caracterizaron cascarilla de cacao en Malasia, encontrando una concentración de 37.9 %, de igual manera, supera a las concentraciones de encontradas por Honorato *et al.* (2015) en *Ceiba pentandra* (41.29 %), *Hevea brasiliensis* (45.34 %) y *Ochroma pyramidale* (40.30 %), y es similar a lo indicado por Velázquez *et al.* (2016) quienes determinaron el rendimiento de celulosa de la paja de cinco variedades de caña de azúcar, las cuales mostraron rendimientos entre 42.1 y 49.8 %.

Cuadro 1. Composición química de los residuos de cacao.

Característica	
Celulosa	45.8 %
Hemicelulosa	51 %
Lignina	49.3 %
Ceniza	0.89 %
Potencial calorífico	4509.05 Cal g ⁻¹
Contenido de glucosa	3.96 g L ⁻¹
Contenido de galactosa	0.684 g L ⁻¹
Contenido de arabinosa	7.32 g L ⁻¹

La hemicelulosa es mayor a los 23.9 % encontrados en Malasia (Daud *et al.*, 2013) en este mismo material. Al comparar el resultado contra especies forestales, se observa que la concentración de hemicelulosa es mayor en la cáscara de cacao que en *Ceiba pentandra* (37.77 %), *Hevea brasiliensis* (34.79 %) y *Ochroma pyramidale* (41.67 %) (Honorato *et al.*, 2015).

La lignina es superior a la de determinada por Daud *et al.* (2013) en cáscara de cacao (14.7 %) y por Honorato *et al.* (2015) quienes estudiaron especies forestales tropicales en con el objetivo de proporcionar información para explorar posibles aplicaciones químicas, encontrando valores de

lignina de 26.24 % para *Ceiba pentandra*, 19.76 % para *Hevea brasiliensis* y 23.02 % para *Ochroma pyramidale*.

Las cenizas encontradas (0.89 %) son menores a las encontradas en *Jatropha curcas* (5.76-6.01 %) (Martínez-Herrera *et al.*, 2016) y en *Moringa olifera* (8.0-10.8 %) (López *et al.*, 2016) en México.

En lo que respecta a potencial calorífico, el mostrado por los residuos del cacao son superiores a los encontrados por Apolinar *et al.* (2017), en *Acacia pennatula* (4428 Cal g⁻¹) y en *Trema micrantha* 4241 Cal g⁻¹, especies forestales utilizadas como leña en el estado de Veracruz.

El contenido de azúcares son inferiores a los reportados por Nápoles *et al.* (2006) quienes al trabajar con hidrolizado de bagazo de cala en Cuba, encontraron valores de arabinosa de 10.2 g L⁻¹ y de glucosa de 10.6 g L⁻¹

CONCLUSIONES

El alto contenido de lignina, así como el potencial calorífico y el contenido de carbohidratos indican que los residuos de cacao tienen potencial para poder emplearse como materia prima en la obtención de subproductos de interés comercial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Afoakwa E. O. "History, origin and taxonomy of cocoa", in *Chocolate science and technology*, (Wiley-Blackwell Publishers, Oxford, UK, 2010) Chapter 1, pp. 3–22.
2. Apolinar-Hidalgo, F., J. A. Honorato-Salazar y G. Colotl-Hernández, "Caracterización energética de la madera de *Acacia pennatula* Schltdl. & Cham. y *Trema micrantha* (L.) Blume", *Revista mexicana de ciencias forestales*, Vol. 8, 39, 2017, pp. 71-82.
3. Barazarte, H., E. Sangronis y E. Unai, "La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas", *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, Vol., 58, 1, 2008, pp. 64-70.
4. Chan, S. y W. S. Choo, "Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks", *Food Chemistry*, Vol. 141, 4, 2013, pp. 3752-3758.
5. Cuervo L., J. L. Folch y R. E. Quiroz, "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol", *BioTecnología*, Vol. 13, 3, 2009, pp.11-25.
6. Daud, Z., M. Kassim, A. Sari., A. Mohd Aripin, H. Awang, M. Hatta, y M. Zainuri, "Chemical Composition and Morphological of Cocoa Pod Husks and Cassava Peels for Pulp and Paper Production", *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol. 7, 9, 2013, pp. 406-411.
7. FAO. 2018. "FAOSTAT: Crops-Cocoa". Consultado el 25 de abril de 2018, Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
8. García P., P., I. Bretón L., C. de la Cuerda C. y M. Cambor A. "Metabolismo colónico de la fibra", *Nutr Hosp*, Vol. 17, 2002. pp. 11-16.
9. Helanto, M., K. Kiviharju, T. Granström, M. Leisola y A. Nyysölä, "Biotechnological production of L-ribose from L-arabinose", *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 83, 1, 2009, pp. 77-83.
10. Honorato-Salazar, J. A., Colotl-Hernandez, G., Apolinar-Hidalgo, F., & Aburto, J. "Main wood chemical constituents of *Ceiba pentandra*, *Hevea brasiliensis* and *Ochroma pyramidale*", *Madera y Bosques*, Vol. 21, 2, 2015, pp. 131-146.
11. Jaimes-Suárez, Y. y F. Aranzazu-Hernández, "Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*)", (Corpoica, Colombia, 2010), 90 p.
12. López H., M. A., J. Basulto G. y M. G. Lozano C., "Evaluación fisicoquímica de 20 materiales de *Moringa oleífera*, cultivados en suelo luvisol", in *Innovación Tecnológica para la Seguridad Alimentaria* (UJAT e INIFAP, Villahermosa, Tabasco, 2016) pp. 355-358
13. López V., L. Y., S. Salgado G., G. I. Bolio L., R. Castañeda C., S. Córdova S., L. del C. Lagunes E. "Determinación del contenido de celulosa de la paja de caña de azúcar", in *Innovación Tecnológica para la Seguridad Alimentaria* (UJAT e INIFAP, Villahermosa, Tabasco, 2016) pp. 524-530.

14. Martínez-Herrera, J., E. Argüello-García y R. Zavala-Gasca, "Evaluación de xuta (*Jatropha curcas* L.) asociada con otros cultivos", in Innovación Tecnológica para la Seguridad Alimentaria (UJAT e INIFAP, Villahermosa, Tabasco, 2016) pp. 324-328.
15. Matos-Chamorro, A. y E. Chambilla-Mamani, "Importancia de la Fibra Dietética, sus Propiedades Funcionales en la Alimentación Humana y en la Industria Alimentaria", *Rev. investig. cienc. tecnol. alimento*, Vol. 1, 1, 2010, pp. 4-17.
16. Mendoza-Vargas, L.; J. Jiménez-Forero, M. Ramírez-Niño, "Evaluación de la pectina extraída enzimáticamente a partir de las cáscaras del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.)", *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, Vol. 20, 1, 2017, pp. 131-138.
17. Okoya, A. A., A. B. Akinyele, E. Ifeanyi, O. S. Amuda, O. S. Alayande y O. W. Makinde, "Adsorption of heavy metal ions onto chitosan grafted cocoa husk char", *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, Vol. 8, 10, 2014, pp. 147-161.
18. Oliva, M., C. Alfaro e I. Palape, "Evaluación del potencial tecnológico de galactomananos del endospermo de semillas de *Prosopis* sp. para el uso en la industria de alimentos", *agriscientia*, Vol. 27, 2, 2010, pp. 107-113.
19. Primo Y., E. "Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Vol. 2", (Reverté, Barcelona, España, 1995).
20. Romero, C. A, J. A. Bonilla, E. G Santos, E. L Peralta. "Identificación varietal de 41 plantas seleccionadas de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de cuatro cultivares distintos de la Región Amazónica Ecuatoriana, mediante el uso de marcadores microsatélites", *Revista Tecnológica ESPOL-RTE*, Vol. 23, 1, 2010, pp. 121-128.
21. Saval, S., "Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro", *BioTecnología*, Vol. 16, 2, 2012, pp. 14-46.
22. SIAP. "Atlas agroalimentario 2017", (SIAP, Ciudad de México, México, 2017) 231 p.
23. Syamsiro, M.; H. Saptoadi, B. H. Tambunan, N. A. Pambudi, "A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia", *Energy Sustain. Development*, Vol. 16, 2012, pp. 74-77.
24. Valdez-Vazquez, I., J. A. Acevedo-Benítez y C. Hernández-Santiago, "Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14, 7, 2010, pp. 2147-2153.
25. Valenciaga, D. y B. Chongo, "La pared celular. Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes", *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Vol. 38, 4, 2004, pp. 343-350.
26. Waizel-Haiat S., J. Waizel-Bucay, J. A. Magaña-Serrano, P. Campos-Bedoya y J. E. Esteban-Sosa, "Cacao y chocolate: seducción y terapéutica", *An. Méd.*, Vol. 57, 3, 2012, pp. 236-245.
27. Xu, Z., S. Li, X. Feng, J. Liang y H. Xu, "L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars". *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 98, 21, 2014, pp. 8869-8878.

IDENTIFICACION FITOQUIMICA DE UNA BOTANA ELABORADA CON XOCONOSTLE (*O. matudae* Scheinvar)

Gema Andrade Solano, María Cornelio Moreno.

Facultad de Químico Farmacobiología. UMSH

RESUMEN

El objetivo de este estudio de dar a conocer cómo se puede dar un uso diferente para aprovechar lo desafortunadamente el aprovechamiento de este no es el deseado, ya que la mayoría de la población no lo aprovecha de una forma que esta se vea beneficiada económicamente. Elaborando una botana deshidratada para mejor aceptación de los consumidores

Al conocer todos los beneficios del xoconostle se pretende que su consumo y producción mejore la economía de los habitantes y productores del estado, pero más que nada que cada familia obtenga o fabrique sus propios productos derivados del xoconostle.

INTRODUCCIÓN

Entre la enorme riqueza de México en plantas cactáceas destaca el nopal tunero, la pitaya y el xoconostle, las cuales han sido domesticadas hasta convertirse en cultivos especializados. Son plantas originarias de zonas áridas y semiáridas, que al ser sometidas a condiciones de cultivo conservan la capacidad de crecer en lugares con poca lluvia y suelos infértiles. El fruto del xoconostle es único, se utiliza como hortaliza y condimento, sin embargo, el xoconostle ha bajado su popularidad con las nuevas generaciones. Con este proyecto, se espera que contribuya a promover su consumo y fomentar su producción, beneficiando a productores, industriales y consumidores

TEORÍA

En un estudio sobre el xoconostle, una especie de tuna ácida, se estimó que hay entre nueve y 15 variedades, las más comunes son el cuaresmeño y el burro o blanco. Estos dos tipos crecen en forma silvestre, aunque ya se cultivan con fines comerciales.

Los principales estados productores de xoconostle son San Luis Potosí, Estado de México, Hidalgo, Puebla y Querétaro, y en menor proporción Aguascalientes, Zacatecas y Guanajuato.

Tiene algunas propiedades benéficas para el ser humano; contiene polisacáridos que producen un efecto contra la Diabetes tipo 2; aporta al organismo importantes cantidades de fibra vitaminas A, C y K, calcio, magnesio, potasio, hierro, cobre, además contiene más antioxidantes que las moras azules y las cerezas.

El xoconostle contiene propiedades para reducir los niveles de colesterol malo (LDL), triglicéridos y azúcar, además de ayudar a controlar problemas gastrointestinales por su alto contenido de fibra, es bueno para la tos, migraña y dolor de cabeza, entre otras.

Este fruto además de sus ya reconocidas propiedades medicinales, forma parte de la cocina ancestral

PARTE EXPERIMENTAL

Caracterización alométrica el diámetro ecuatorial (de) y diámetro longitudinal (dl) se midió según lo establecido en la norma mexicana nmx-ff-009-1982. El resultado fue expresado en cm. la medición del peso se expresa en gr, de manera individual a cada fruto.

Color instrumental Se utilizó un colorímetro de Reflectancia Hunter Lab Marca Color Flex® para obtener las coordenadas de color Luminosidad, *a* y *b*. °Hue.

Caracterización fisicoquímica

Análisis proximal del xoconostle se determinó de acuerdo a la metodología de AOAC. La fibra dietética se realizó usando la metodología enzimática de Prosky *et al.*, 1998. El Análisis sensorial se determinó mediante la prueba hedónica usando 25 panelistas La deshidratación del xoconostle se determinó osmóticamente con deshidratación solar.

RESULTADOS

Peso y tamaño del fruto, Se especifican las medidas de los diámetros ecuatoriales (DE 44cm y los longitudinales (DL 53cm Características alométricas del xoconostle fruto peso73gr, semilla 7grLos

parámetros de color s luminosidad se encontró 40.39 en fresco y 23 en deshidratado L=40.39,b=7.26,a=10,diferencia de color,42.24,en deshidratado=23,b=,6.6,a=4.55,diferencia decolor,25.22

El producto con mayor aceptación fue el de 7h en deshidratación osmótica con 55 °Brix con consistencia más suave. La determinación de % humedad para las pruebas fue H5, 10.8836±0.42,H7, 11.53±0.7191,H21,8.48±1.0093%

Análisis sensorial. Se evaluaron los parámetros color, olor, sabor y textura. En la Tabla 1, se observan los resultados obtenidos de acuerdo a la elección de los 25 panelistas. Análisis sensorial del xoconostle

SENSORIAL	COLOR	OLOR	SABOR	TEXTURA
H7	3.92±0.57	4.16±0.85	4.16±0.85	4.16±0.85
H21	3.92±0.86	3.44±0.82	3.60±0.91	3.33±0.92
H5	3,12±0.78	3.32±0.80	3.44±1.04	3.40±1.11

Los resultados obtenidos en el análisis proximal del xoconostle fresco y deshidratado son los siguientes fresco humedad 89.81±0.30, cenizas 0.59±0.21%, proteína0.24±0.03extracto FD, 17.22 fruto deshidratado, humedad 11.53±0.71, cenizas 1.25±0.03, proteína 0.03±0.07.FD17.7%

CONCLUSIONES

Al analizar los resultados sensoriales, los resultados son favorables ya que tuvo aceptación por el público. En cuanto su composición nutrimental, la fibra dietética presentó mayor porcentaje en fruto deshidratado que en fresco, misma tendencia se ve reflejada en los otros componentes químicos. El xoconostle es un fruto milenario que antiguas generaciones lo han usado como condimento en la cocina y se ha venido perdiendo su uso a través de las nuevas generaciones. Este proyecto se enfoca en dar una presentación diferente y atractiva para su consumo como fruta deshidratada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Griffith, M. P. (2004). The Origins of an Important *Cactus Crop*, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): New Molecular Evidence. *American Journal of Botany* 91 (11): pp. 1915–1921
2. Guzmán M.S., Mondragón J.C., Herrera H.M., Guevara L.F. y Reynoso C.R. (2009). *Xoconostle, Prácticas Básicas para su Producción*. INIFAP, México. pp. 5-11

CINÉTICA DE LIBERACIÓN EN AGUA DE UN PLAGUICIDA INMERSO EN UNA MATRIZ POLIMÉRICA

Nereo Jaimes Yañez^{1*}, María de la Luz Jiménez Núñez¹, Beatriz García Gaitán¹, Rosa Elvira Zavala Arce¹, Marithza Guadalupe Ramírez Gerardo², José Luis García Rivas¹, Beatriz Millán Olvera¹

¹TecNM/Instituto Tecnológico de Toluca. Av. Tecnológico s/n. Colonia Agrícola Bellavista Metepec, Edo. De México, México C.P. 52149. ² Tecnológico de Estudios Superiores de Villa Guerrero. Carretera Federal Toluca - Ixtapan de la Sal KM 64.5, La Finca, Villa Guerrero.

*Jaimess989@hotmail.com

RESUMEN

Las malas prácticas de aplicación de insecticidas en los cultivos traen consigo problemas de salud, contaminación ambiental y altos costos, según Mahmood et al., (2015) del 80 al 90% del producto aplicado no es aprovechado por el cultivo, por lo tanto, se necesitan materiales que garanticen el aprovechamiento de los plaguicidas. En este trabajo se sintetizaron perlas de matriz polimérica a base de alginato y el ingrediente activo (i.a.) imidacloprid y se realizó la cinética de liberación del i.a. en agua.

La síntesis de las perlas de alginato-imidacloprid se realizó mezclando una solución de alginato de calcio al 1% en peso con el i.a. (0.3 %) en agitación constante y a continuación se goteó con una bomba peristáltica en una solución de cloruros de calcio 1M y de sodio 0.9 M, dejándolas madurar en dicha solución; posteriormente se retiraron y se liofilizaron para su almacenamiento, caracterización y cinética de liberación

Las esferas se caracterizaron por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR). La cinética de liberación consistió en poner las esferas en agua durante 10 días en agitación constante en un orbital magnético a 200 rpm, tomando alícuotas 250 µL a los 30 min y cada hora durante 10 h y las siguientes una cada 24 h; se aforaron a 5 mL con etanol para su lectura en el UV-Vis, las concentraciones obtenidas fueron de 0 a 497.69 mg/L

De acuerdo con los resultados de la cinética, se puede concluir que la liberación del i.a. alcanza el equilibrio a las 100 h lo que podría permitir la dosificación gradual del insecticida, evitando posibles procesos de contaminación debido a la dispersión en el medio.

Palabras claves: Imidacloprid, alginato, insecticida, ingrediente activo.

INTRODUCCIÓN

En la última década, el uso de neonicotinoides ha estado aumentando más rápido que otros insecticidas como carbamatos, organofosforados y piretroides, debido principalmente a su excelente actividad sistémica en la planta junto con la eficacia reducida de otros insecticidas neuroactivos. El Imidacloprid N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl) methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl] nitramida, el primer miembro de neonicotinoides que fue introducido comercialmente en el mercado en 1991 por Bayer AG y Nihon Tokushu Noyaku Seizo KK, se usa en todo el mundo como insecticida para controlar las plagas de succión, minería y como control de las pulgas que atacan principalmente las mascotas domésticas. Imidacloprid es un insecticida sistémico utilizado para tratamiento de semillas, suelo y aplicaciones foliares, actuando sobre las especies objetivo a través de la ingestión o el contacto directo y el bloqueo de la nicotinérgica vía neuronal (Jiang *et al.*, 2014).

El imidacloprid tiene una alta solubilidad relativa y estabilidad en el agua lo que ocasiona que sea un potencial contaminante de la superficie y aguas subterráneas a través de la deriva, escorrentía disuelta o lixiviación. Cada vez es más común encontrar un sistema acuático contaminado por este producto sintético, causando grandes preocupaciones sobre su impacto en el medio ambiente y el impacto reflejado en los humanos. Estudios recientes han confirmado la toxicidad de imidacloprid y sus efectos causantes sobre los organismos acuáticos, incluidos invertebrados, crustáceos, algas y peces.

El uso de la formulación de liberación controlada (FLC) es una estrategia para reducir el uso y el impacto de los pesticidas en el medio ambiente. Hasta la fecha, se han propuesto muchos tipos de FLC de plaguicidas, entre ellas se encuentra la encapsulación de ingredientes activos soportados en

una matriz polimerimérica, que a su vez estas son principalmente de biopolímeros amigables con el ambiente (Jiang *et al.*, 2014).

TEORÍA

Los insecticidas son sustancias que sirven para combatir a los organismos que afectan el desarrollo de los cultivos y del ganado. Normalmente incluyen compuestos de las clases de organofosfatos, carbamatos, piretrinas, piretroides sintéticos y organoclorados. Los dos primeros son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, mientras que los tres últimos afectan los canales iónicos de las neuronas, los cuales son regulados por voltaje y sirven para transmitir impulsos nerviosos a través de potenciales de acción que se esparcen por las dendritas y axones (Skinner, 2005). El imidacloprid pertenece al grupo de los neonicotinoides, es un insecticida que actúa sobre el sistema nervioso central de insectos como un agonista del receptor nicotínico de acetilcolina. (Bianchi *et al.*, 2015)

El imidacloprid es un insecticida sistémico, relacionado químicamente con la toxina del tabaco, la nicotina, tiene una fórmula química presentada en la figura 1; De manera que su forma condensada es $C_9H_{10}ClN_5O_2$ con un peso molecular de $255.66 \frac{g}{gmol}$. El imidacloprid tiene una amplia variedad de usos como en suelos, las semillas y el foliar. Se utiliza para controlar a los insectos chupadores, ácaros como también los saltamontes de la hoja y de la planta del arroz, los áfidos o pulgones, los trips y la mosca blanca entre otro (Cox, 2001).

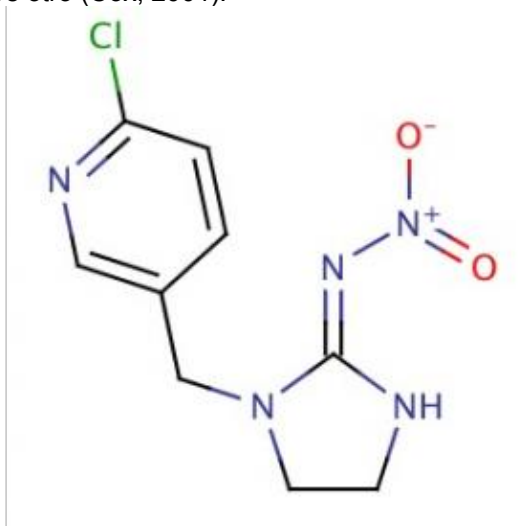


Figura 1. Fórmula química del imidacloprid (Lerda Unión Química S/A, 2008)

El término hidrogel se utiliza para denominar a un tipo de material de base polimérica caracterizado por su extraordinaria capacidad para absorber agua y diferentes fluidos. La hidrofilia de estos geles es debido a grupos como: -OH, -COOH, -CONH₂, y -SO₃H. Esta propiedad de absorber agua les convierte en materiales de enorme interés, sobre todo en la medicina como sistemas de liberación controlada y/o sostenida de principios activos. Estos hidrogeles se obtienen mediante polimerización y entrecruzamiento simultáneo de uno o varios monómeros mono o polifuncionales. Las características de estos monómeros (tipo de grupos que lo forman) y el grado de entrecruzamiento determina las propiedades de hinchamiento del xerogel (hidrogel seco) y por tanto su aplicabilidad. En la mayoría de los casos, un solo monómero no proporciona al mismo tiempo buenas propiedades mecánicas y gran retención de agua, por ello es necesario recurrir a la copolimerización, para poder obtener un mejor compromiso de estas dos propiedades (Anón 2016).

El alginato es un copolímero lineal que consiste en unidades de α-L-gulurónico y β-D-manurónico ácido que se utiliza ampliamente debido a su espesamiento, estabilización y propiedades gelificantes. La interacción entre los iones divalentes y bloques gulurónicos forman una estructura llamada "modelo de caja de huevos".

Estas características hacen que tenga muchas aplicaciones en la industria alimentaria, textil, papel, cosméticos y las industrias farmacéuticas, así como en el área médica. En la actualidad, la principal fuente de alginato para este tipo de aplicaciones son las algas pardas (Müller *et al.*, 2011).

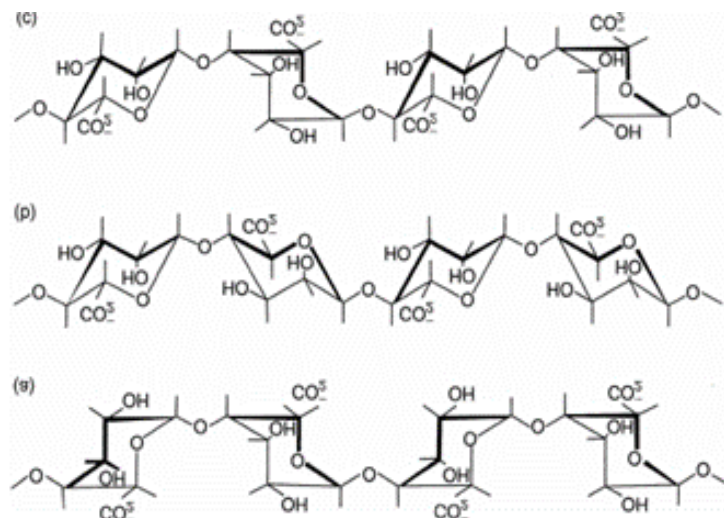


Figura 2. Estructura del alginato: (a) (1 → 4) -α-L-gulurónico bloques de ácido (GG), (b) (1 → 4) bloques de ácido β-D-manurónico (MM) y (c) Secuencias heteropoliméricas de M y G (MG bloques) (Rinaudo, 2014).

La cinética de liberación; se define como un proceso a través del cual uno o más agentes activos o ingredientes se hacen disponibles desde un dispositivo, en un determinado lugar, a una determinada velocidad, como efecto de un estímulo específico en alguna etapa de un proceso. También se le llama “liberación lenta” (“slow release”), implicando que el principio activo se hace disponible en el medio a una velocidad menor que la que se tendría en ausencia del dispositivo. Algunos autores diferencian el término “controlada” de “sostenida”, implicando con la primera denominación que la dosis de principio activo que se libera es constante en el tiempo, a diferencia de la segunda, en que la dosis liberada podría no ser constante. En este trabajo, los términos “sostenida” y “controlada” se utilizan como sinónimos, al igual que en la mayor parte de la bibliografía revisada.

PARTE EXPERIMENTAL

La investigación se realizó en el laboratorio de síntesis de aplicaciones de materiales, ubicado en el área de investigación del Instituto Tecnológico de Toluca.

La síntesis de las perlas de Alginato-Imidacloprid se realizó de la siguiente manera; con una solución de alginato al 1% en peso y una solución del ingrediente activo (imidacloprid) al 0.3%. Una vez que la solución de alginato fue homogénea se mezcló con la solución del i. a., la mezcla de ambas soluciones se sometió a agitación constante durante un periodo de 40 min aproximadamente, ya que la mezcla era totalmente homogénea se prosiguió con el goteo para la formación de las esferas, esto se llevó a cabo con la ayuda de una bomba peristáltica de flujo continuo (marca) y una aguja de jeringa del No. 16. Las esferas fueron goteadas en una solución de cloruros de calcio 1M y de sodio 0.9 M, dejándolas madurar en dicha solución.

Las esferas de retiraron de la solución de cloruros y se sometieron en un recipiente térmico, se les aplicó nitrógeno líquido para su congelación, las esferas se colocaron en la liofilizadora, transcurrido el tiempo las esferas fueron retiradas del equipo y almacenadas en frascos en una zona libre de humedad, el 25% de las esferas fueron caracterizadas por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).

Cinética de Liberación del ingrediente activo

En un Matraz Erlenmeyer se colocaron 750 mL de agua destilada con un pH ajustado a 6, dentro de esa solución se colocaron las esferas de Alginato-Imidacloprid y se sometieron en agitación constante en un orbital magnético a 200 rpm durante un periodo de 10 días. Las primeras

evaluaciones fueron de 0 a 10 horas con intervalos de 1 hora. Posteriormente solo tomo muestra cada 24 horas hasta el décimo día, para las mediciones se tomaron alícuotas de 250 μ L. todas las muestras obtenidas se aforaron a 5 mL con etanol para su lectura en el UV-Vis Thermo Fisher SCIENTIFIC modelo G10S.

RESULTADOS

Se obtuvieron perlas de un diámetro de 2mm aproximadamente, el tamaño de las perlas fue homogéneo, dentro de las características de las perlas se pudo notar su forma esférica y una coloración opaca, este tipo de coloración está relacionada con los polímeros amorfos.

Cinética de liberación.

Se realizaron cinéticas de liberación utilizando los hidrogeles de Alginato-imidacloprid (AI-I). La Figura 3 muestra que la liberación del imidacloprid en agua, en donde se aprecia que es muy rápida y que el tiempo para alcanzar el equilibrio de concentración fue de 100 horas. La figura 4 muestra los datos obtenidos de las mediciones. Dando como resultado la concentración del ingrediente activo liberado durante los 10 días de experimentación. En la figura 4-1 se puede apreciar la curva estándar de calibración del equipo de uv-vis con que se trabajó.



Figura 3. Cinética de liberación de un plaguicida por hidrogeles de AI-I partiendo de una concentración inicial de 0 mg/L.

HORA	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
mg/750 mL	0	89.6	129.1	170.33	197.8	228.38	242.23	260.6	285.7	288.08	305.33	320.7	407.83	486.5	498.9	523.2	533.24	536.7	526.4	529.2	546.83	546.83

Figura 4. Liberación del ingrediente activo en agua, valores obtenidos mediante uv-vis.

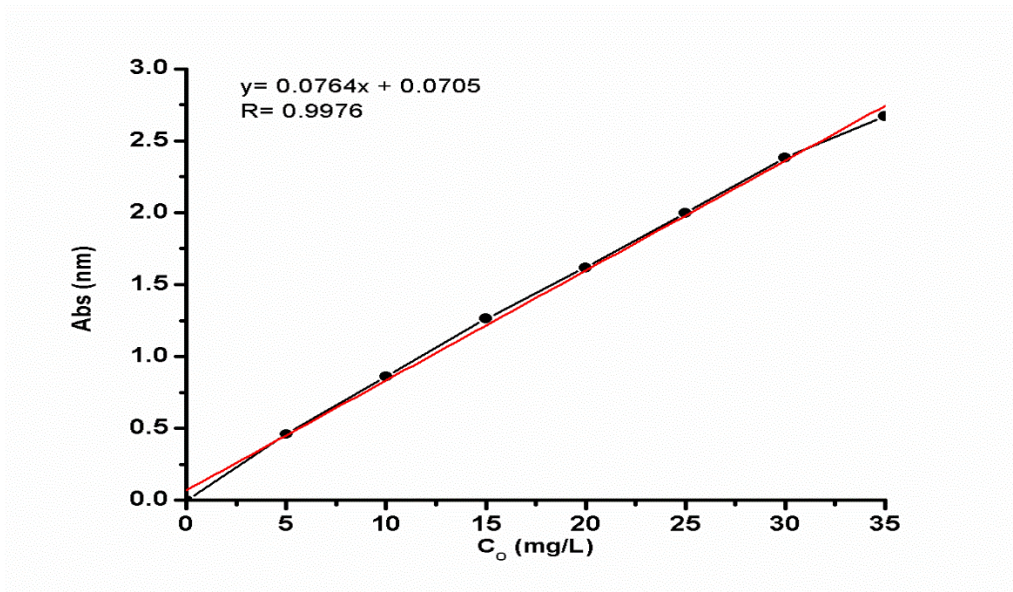


Figura 4-1 curva de calibración estándar.

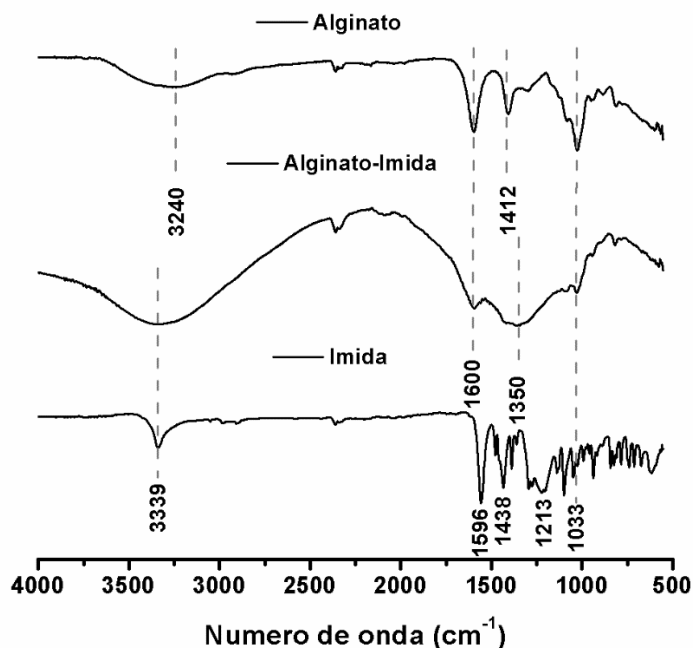


Fig.5. Espectros FTIR de alginato, alginato- imidacloprid e ingrediente activo imidacloprid

El espectro de FTIR de alginato de sodio mostró picos a 3240 cm^{-1} correspondientes a la estirando la vibración de -OH grupos. Las absorciones en 1613, 1417, 1093 y 1029 cm^{-1} , indicar la vibración de estiramiento de los grupos -CO-, -COOH, C-O y C-O-C, respectivamente. Los picos de absorción son característicos de la estructura de polisacárido de alginato de sodio.

Asignado a la banda de vibración de N = N en el anillo de imidazolidina de imidacloprid. El pico de absorción a 1213 cm^{-1} se asigna a la vibración de estiramiento de C = N en el anillo de piridina. Los resultados FTIR de imidacloprid se encontraron similares a los anteriores estudios de Phugare et al., 2013

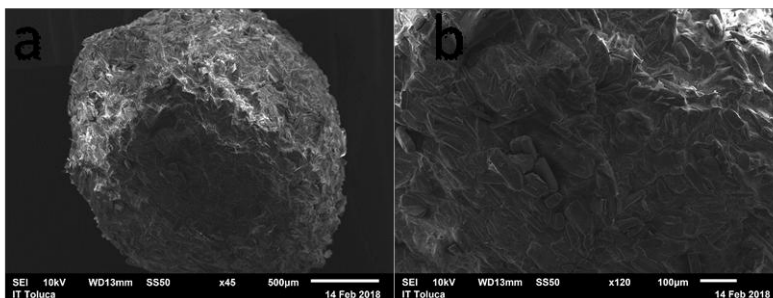


Figura 7. Micrografía MEB de capsulas de alginato cargadas con imidacloprid (a) a $\times 45$, (b) a $\times 120$ de aumento.

De acuerdo con Lim y Ahmad, en el 2018. La superficie de las microcápsulas apareció rugosa con racimos visibles de la mezcla del biopolímero. La sección transversal la morfología de la membrana de alginato se muestra en la figura b. El áspero y superficie arrugada de la microcápsula descargada se debe a la formación de polielectrolito complejo entre el alginato y el ingrediente activo. La membrana del complejo polielectrolito tiene una superficie irregular y fibrosa, causada por poros y grupos de alginato y partículas agregadas. Es beneficioso mejorar la propiedad de barrera de las microcápsulas. Después de la carga, se pueden observar micropartículas de imidacloprid en la superficie y se muestra en la figura b.

CONCLUSIONES

Los hidrogeles alginato-imidacloprid demostraron que se pueden utilizar para la liberación gradual de ingredientes activos sintéticos, con base a esto se puede concluir que la liberación de estos activos atrapados en una matriz polimérica a base alginato se estarán liberando de manera pausada una vez que estos estén en contacto con el agua, esto nos permitirá que las sustancias químicas no se conviertan en un agente contaminante para el medio ambiente al momento de su liberación en campo en los diferentes cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anon, (2016). Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 56, pp.382-393
2. Barón Cortés, A., Barrera Ramírez, I., Boada Eslava, L. F., & Rodríguez Niño, G. (2007). Evaluación de Hidrogeles para aplicaciones agroforestales. 35-44.
3. Bianchi, J., Cabral-de-Mello, D. and Marin-Morales, M. (2015). Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and Salmonella typhimurium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, pp.174-183.
4. Cox, C. (2001). imidacloprid. *Journal of Pesticide Reform*.
5. Jiang, L., Mo, J., Kong, Z., Qin, Y., Dai, L., Wang, Y. and Ma, L. (2014). *Effects of organobentonites on imidacloprid release from alginate-based formulation*.
6. Lim, G. and Ahmad, M. (2017). *Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks*.
7. Müller, J. M., Lopez dos Santos, R., & Viera Brigido, R. (2011). Producción de alginato por microorganismos. *Polímeros: Ciencia y Tecnología*, 21(4), 305-310.
8. Rinaudo, M. (2014). Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 92-96.
9. S.S. Phugare, D.D. Kalyani, Y.B. Gaikwad, J.P. Jadhav, Chem. Eng. Sci. 230(2013) 27–35.
10. Skinner, J. (2005). In commonly used pesticide chemical classes. *Pest control technical note*, 1-4.

CONCENTRACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO AMILOLÍTICO PRODUCIDO POR *FUSARIUM OXYSPORUM* EN ALMIDÓN DE AGUA DE ARROZ

Lizbeth Nayelly Velázquez Santillán; Eduardo Rodríguez Cuevas; Paola Solís Vences; Janeth Fuentes Hernández.

Universidad Tecnológica de Tecámac

RESUMEN

Las gramíneas como el maíz, el trigo o el arroz son la base de la alimentación humana, predominando este último en los países del lejano oriente. En México, se consumen 1100 000 toneladas anuales de este grano, que previo a su envasado o industrialización se libera una gran cantidad de almidón, presente en forma de amilosa y amilopectina, producto de lavados previos, fuente importante de contaminación a cuerpos de agua. Por ello, en el presente trabajo tuvo como objetivo concentrar y caracterizar en su forma primaria un extracto amilolítico producido a partir del hongo *Fusarium oxysporum* usando como fuente de carbono el almidón del agua de enjuague de arroz, con la finalidad realizar estudios previos de una alternativa de tratamiento de dicho efluente y la obtención de azúcares fermentables para la producción de biocombustibles en etapas posteriores. Para lo anterior se desarrollaron tres etapas: en la primera se hizo crecer al hongo *Fusarium oxysporum* en un medio con 1 mg/mL de almidón del agua de arroz y una solución basal de 0.2g de K_2HPO_4 , 0.2g de KH_2PO_4 y 1g de $(NH_4)_2SO_4$ en 100 mL de agua destilada, en fermentación sumergida durante 72 horas, del que se obtuvo un extracto crudo amilolítico con un actividad enzimática de 0.3220 U/mL. En la segunda etapa se concentró el extracto enzimático fúngico por salado con $(NH_4)_2SO_4$ a diferentes concentraciones, seguido de una diálisis, registrándose una mayor actividad hidrolítica (0.874113U/mL) a una concentración del 20% de $(NH_4)_2SO_4$. Por último en la tercera etapa, se determinó el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática, con el objetivo de caracterizar el extracto concentrado obtenido. Para ello se expuso el complejo amilolítico a un gradiente de temperatura y de pH, teniendo una mejor actividad a 40°C y un pH de 7.

INTRODUCCIÓN

La cocina mexicana es muy famosa por la variedad de sus platillos. Dentro de la misma, el arroz es un alimento frecuentemente elegido por las amas de casa y restaurantes. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes relacionados al consumo de arroz es el alto porcentaje de almidón. Dichos residuos son aprovechados por microorganismos heterótrofos, como el hongo *Fusarium oxysporum*, que degradan los enlaces del almidón, liberando glucosa fácilmente asimilable para otros microorganismos, dando paso a su reproducción, generando así una contaminación descontrolada. Para contribuir en la disminución de la contaminación desencadenada por el desecho de almidón, el presente trabajo se enfoca en la Caracterizar en una etapa primaria el concentrado amilolítico a partir del monitoreo del efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática, cuya importancia radica en proporcionar aplicaciones industriales a las amilasas obtenidas con la finalidad de elaborar o transformar algún producto ya existente, al ser enzimas importantes a nivel mundial (Durango, 2008), debido a que son utilizadas en la obtención de maltosa para jarabes de cerveza o confituras, en la industria panadera en el procesos de fermentación, en la industria textil para la remoción de almidón, en la industria farmacéutica en medicamentos para trastornos digestivos, en la generación de dextrinas para uso en espesantes, en la industria de los biocombustibles, entre otros. Por consiguiente, se ha reportado que el comercio de las enzimas ha dejado ganancias de 142 millones de dólares anuales, por lo cual, es un campo con oportunidades de crecimiento e innovación para el proyecto que se está desarrollando, siendo una posibilidad de aplicación la producción de biocombustibles.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención del extracto enzimático

Fermentación

Se preparó el medio de fermentación con almidón de arroz a concentración de 1 mg/mL y una solución basal previamente ajustadas a pH 5 y esterilizadas, en seguida se inoculó con 1×10^6 esporas/mL de *Fusarium oxysporum* y finalmente se incubó a 37 °C, 60 rpm, durante 72 horas. Después de este tiempo, se filtró al vacío, posteriormente el filtrado se mantuvo en refrigeración hasta su posterior uso.

Actividad enzimática

Se colocaron 0.5 mL de la solución de almidón al 1% y 0.4 mL de buffer de acetatos previamente ajustados a pH 5 y se mantuvieron a 45 °C, en seguida se adiciono 0.1 mL del filtrado enzimático, se dejó reaccionar durante 20 minutos. Al término de este tiempo, se le agregaron 2 mL de DNS y se sometieron a ebullición durante 5 minutos. Por último, se le adicionan 5 mL de agua, se agitan y leyeron a 575 nm.

Concentración enzimática a partir de Salting in - Salting out

Prueba tamiz para concentración del extracto enzimático

Se colocaron 4 mL de la solución de sulfato de amonio (5, 10, 15, 20 y 25%) y 1 mL del extracto enzimático y se dializo durante 24 horas en seguida se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. La parte del sobrenadante fue el resultado de un Salting in y la parte del precipitado, un Salting out, el cual se resuspendió en una buffer de fosfatos. Se evaluó la actividad enzimática de cada una de las muestras para determinar la mejor concentración de sulfato de amonio.

Concentración enzimática

Para comenzar con la concentración enzimática, se prepararon dos muestras que contenían 16 mL de la solución de sulfato de amonio al 20% y 4 mL del extracto enzimático. Fueron centrifugadas y el resultado del Salting out fue resuspendido en 2 mL de buffer de fosfatos. En seguida se adicionó en membranas de celulosa (previamente esterilizadas en 500 mL de la Solución de glicerol al 5%), las cuales se mantuvieron sumergidas en agua estéril dentro de un matraz a 90 rpm y en refrigeración durante 24 horas, iniciando la primera diálisis. Terminado el tiempo preestablecido, en condiciones de esterilidad, se tomó una muestra de 100 mL del agua estéril. Se realizó una prueba cualitativa de presencia de fosfatos. El proceso de diálisis se repitió cambiando el agua estéril las veces que fueron necesarias hasta que la prueba de fosfatos no mostro turbidez.

Caracterización primaria de la enzima

En un tubo de ensaye se colocaron 0.4 mL de buffer (de acetatos de pH 4-5.5 y de fosfatos a pH 6-8) y 0.5 mL de la solución al 1%, en seguida se incubó 5 minutos. Se le agregaron 0.1 mL del concentrado enzimático y se dejó reaccionar por 20 minutos esto a las temperaturas indicadas en la tabla 1. Al finalizar el tiempo, se le agregaron 2 mL de DNS y se sometió a ebullición por 5 minutos. Pasado el tiempo, se le adicionaron 5 mL de agua, se agitó y leyó a 575 nm. Este procedimiento se llevó a cabo a diferentes temperaturas y pH como se muestra en la siguiente tabla 1.

Tabla 2. Condiciones de caracterización enzimática

Temperatura	pH
25°C	4
30°C	4.5
35°C	5
40°C	5.5
45°C	6
50°C	6.5
	7
	7.5
	8

RESULTADOS

Resultados de Obtención del extracto enzimático

El extracto aminolítico se obtuvo a partir de almidón de arroz a una concentración de 1 mg/mL que fue inoculado con esporas de *Fusarium oxysporum* con el objetivo de obtener un medio de

fermentación que produjera un extracto aminolítico, al cual fue necesario determinar la actividad enzimática mediante la técnica de DNS, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 3. Actividad enzimática de extracto aminolítico crudo

Concentración de la solución de almidón	Promedio UI/ml
1 mg/m	0.322042

Respecto a la fermentación líquida o sumergida que se utilizó en este trabajo, Díaz, (2009), señala en su investigación Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida, que esta técnica es importante porque permite el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa, dando como resultado un extracto enzimático con las cualidades requeridas para realizar la concentración y caracterización primaria del mismo.

Aunado a esto, se realizó una curva de glucosa para hacer la comparación entre ella y los resultados obtenidos al leer las muestras en el espectrofotómetro.

En la Tabla 2, se muestran los datos referentes a la cantidad de μ moles de glucosa liberados al hacer reaccionar el almidón con el extracto aminolítico durante 20 minutos a condiciones previamente establecidas.

Rubiano, (2006) señala que, como las amilasas hidrolizan moléculas de almidón, para obtener diversos productos como la dextrina, la velocidad de reacción de enzima depende de varios factores, uno de ellos es la concentración de la enzima, puesto que a mayor concentración permite la transformación de una mayor cantidad de sustrato en menor tiempo.

Prueba tamiz para concentración del extracto enzimático

Para iniciar con la caracterización, se llevó a cabo la concentración de la enzima mediante el método de salting in-salting out, para ello se consideraron 5 concentraciones diferentes de sulfato de amonio: 5, 10, 15, 20 y 25%. La parte del sobrenadante fue el resultado de un Salting in y la parte del precipitado, un Salting out. Posteriormente, se evaluó la actividad enzimática de las muestras, concluyendo que la concentración idónea fue la obtenida por Salting out al 20%, de lo que se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 4. Concentraciones de sulfato previo a la diálisis

Concentración de la solución de almidón	Concentración de sulfato de amonio	Muestras	μ mol de glucosa liberados
1 mg/mL	5%	Precipitado	0.046006
		Sobrenadante	0.092012
	10%	Precipitado	0.184023
		Sobrenadante	0.092012
	15%	Precipitado	0.046006
		Sobrenadante	0.138017
	20%	Precipitado	0.874113
		Sobrenadante	0.138017
	25%	Precipitado	0.046006
		Sobrenadante	0.276035

Como menciona Huerta (2012) en el trabajo *Planta piloto para fermentaciones*, el Salting out es un fenómeno físico-químico basado en las interacciones electrolito-no electrolito, en el cual a altas concentraciones salinas algunos solutos como proteínas (enzimas) precipitan debido al aumento de

las interacciones hidrofóbicas entre ellos. Este método fue empleado con sulfato de amonio para la separación de proteínas para realizar a la diálisis, ya que la sal estableció puentes de hidrógenos con el agua y al hacerlo sustrajo el agua de la enzima. De este modo, la conformación de la enzima se modifica para evitar la exposición con sus residuos apolares, por lo tanto, lleva a la formación de plegamientos que propician su precipitación.

Como se observa en la tabla 3 la mayor actividad se obtiene al concentrar con sulfato de amonio al 20%.

Diálisis

Tabla 5. Resultados de la actividad enzimática del precipitado después de la diálisis

Concentración de la solución de almidón	μmol de glucosa liberados
1 mg/mL	0.920119

Sánchez (2013), señala que para elegir un método de purificación o concentración enzimática es indispensable conocer características particulares de la enzima, la cual es una amilasa con peso molecular de 35-50 KDa, según señala Pedrosa en 1999, en su tesis de maestría *Producción de amilasa termoestable a partir de Thermus sp.* En este trabajo fue de utilidad conocer tal dato para elegir la membrana de celulosa utilizada en la diálisis.

Al finalizar la diálisis, se procedió a realizar nuevamente el cálculo de la actividad enzimática de las muestras del concentrado enzimático, con la finalidad de determinar si la proteína permanece activa o pierde su actividad biológica al ser dializada, lo cual sugiere Greaves Fernández nuevamente.

Como se puede observar en la Tabla 4, hubo un incremento en los μmoles de glucosa liberados del extracto crudo con 0.368047 $\mu\text{moles}/\text{ml}$ con respecto al obtenido después de la diálisis con un 0.920119 $\mu\text{moles}/\text{mL}$, dando un incremento de 0.552079 $\mu\text{moles}/\text{mL}$. Lo que demuestra que hay mayor actividad amilolítica después de concentrar el extracto enzimático y dializarlo.

Resultados de la Caracterización primaria del extracto aminolítico

Para dar comienzo a la caracterización primaria del extracto aminolítico producido por *Fusarium oxysporum*, se determinó utilizar las siguientes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45 y 50°C, evaluando en cada una de ellas los siguientes valores de pH: 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0, continuando con el análisis por medio del método de DNS para la determinación de la actividad enzimática de cada muestra. Se utilizó el matraz 1 que contiene el extracto en su forma cruda.

Tabla 6. Resultado de Caracterización primaria (T - 25°C)

Concentración de la solución de almidón	Temperatura	pH	Promedio μmoles de glucosa liberado
1 mg/mL	25°C	4.0	0.337377
		4.5	0.49073
		5.0	0.567407
		5.5	0.337377
		6.0	0.168689
		6.5	0.444724
		7.0	0.107347
		7.5	0.199359
		8.0	0.153353

Tabla 7. Resultado de Caracterización primaria (T - 30°C)

Concentración de la solución de almidón	Temperatura	pH	Promedio μ moles de glucosa liberados
1 mg/mL	30°C	4.0	0.306707
		4.5	0.414054
		5.0	0.751431
		5.5	1.165485
		6.0	0.935455
		6.5	0.322042
		7.0	0.276036
		7.5	0.628748
		8.0	0.337377

Tabla 8. Resultado de Caracterización primaria (T - 35°C)

Concentración de la solución de almidón	Temperatura	pH	Promedio μ moles de glucosa liberados
1 mg/mL	35°C	4.0	0.383383
		4.5	0.322042
		5.0	0.674754
		5.5	0.475395
		6.0	0.996796
		6.5	1.058138
		7.0	1.134814
		7.5	0.95079
		8.0	0.644084

Tabla 9. Resultado de Caracterización primaria (T - 40°C)

Concentración de la solución de almidón	Temperatura	pH	Promedio μ moles de glucosa liberados
1 mg/mL	40°C	4.0	0.444724
		4.5	0.153353
		5.0	0.674754
		5.5	0.322042
		6.0	0.49073
		6.5	0.337377
		7.0	1.45686
		7.5	0.981461
		8.0	0.19936

Tabla 10. Resultado de Caracterización primaria (T - 45°C)

Concentración de la solución de almidón	Temperatura	pH	Promedio μ moles de glucosa liberados
1 mg/mL	45°C	4.0	0.95079
		4.5	0.613413
		5.0	0.521401
		5.5	0.674754
		6.0	0.475395
		6.5	0.996796
		7.0	0.429389
		7.5	0.582742
		8.0	0.352713

Tabla 11. Resultado de Caracterización primaria (T - 50°C)

Concentración de la solución de almidón	Temperatura	pH	Promedio μ moles de glucosa liberados
1 mg/mL	50°C	4.0	0.705425
		4.5	0.751431
		5.0	0.567407
		5.5	0.521401
		6.0	0.429389
		6.5	0.705425
		7.0	0.674754
		7.5	0.659419
		8.0	0.521401

Como se puede observar en los resultados, la actividad de la enzima producida por *Fusarium oxysporum* muestra estabilidad térmica entre 25-50°C y su óptimo a 40°C. Sin embargo los parámetros reportados para las enzimas α -amilasas de *Penicillium commune* estudiadas por Espinel y López en su trabajo llamado *Purificación y caracterización de α -amilasa de *Penicillium commune* producida mediante fermentación en fase sólida* del año 2009. Señalan que la estabilidad térmica de la enzima se presentó en el intervalo de temperatura 0-50°C y su temperatura óptima fue 70°C, y que entre los principales productos de hidrólisis del almidón de yuca se encuentran la maltosa y la glucosa, este resultado proporciona evidencia de que la enzima es capaz de romper los enlaces glicosídicos α -1,4 del almidón, comportamiento característico de una α -amilasa. Gupta, *et. al.* (2003), mencionan en su trabajo *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*, que los parámetros de pH óptimo de α -amilasas oscila entre 2.0 y 12.0, aunque la mayoría tiene un pH ligeramente ácido a neutro, rango en el que se encuentra el pH de la α -amilasa de *Fusarium oxysporum* (pH 7).

CONCLUSIONES

Al realizar una fermentación en estado líquido para obtener el extracto aminolítico crudo producido por *Fusarium oxysporum*, se utilizó almidón de arroz comercial como sustrato, el cual tuvo una concentración de 1 mg/ml, previamente establecida tras la determinación de concentración de almidón en diversas muestras. Además se utilizó el método de DNS para determinar la actividad enzimática del complejo amilolítico producido por *Fusarium oxysporum*, fue de 0.32209 UI/ml. Se

concentró el extracto enzimático con sulfato de amonio al 20% y la mayor actividad la tuvo en el precipitado 0.8741 U/mL.

La temperatura y el pH tienen efecto sobre la actividad de α -amilasa teniendo una estabilidad térmica de 25- 50 °C y un óptimo a 40°C y pH de 7.

BIBLIOGRAFÍA

1. D. P. Daniel. Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida. Chihuahua México.2009. pp 33-57
2. D. B. Eder. Producción de enzimas amilasa microbiana mediante fermentación en estado líquido. 2008. Universidad Pontificia Boliviana. pp 6.
3. E. Esperanza & L. Elizabeth. Purificación y caracterización de alfa-amilasa de penicillium commune producida mediante fermentación en fase sólido. 2009. Rev. colomb. quim., Volumen 38, Número 2, p. 191-208,
4. Gupta Rani, Paresh Gigras, Harapriya Mahopatra, Vineet Kumar Woswami, Bhavna Chauhan. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. 2003. Volumen 38. pp1599
5. H. O. Sergio. *Planta piloto de fermentaciones. Departamento de Biotecnología* 2012. Recuperado el 3 de septiembre de 2017 de <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Precipitacion.pdf>
6. S. N. Sobeida. *Bioquímica experimental: Estructura y propiedades de las proteínas*. 2013. Recuperado el 2 de septiembre de 2017 de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MATERIALAPOYOANTECEDENTES_22427.pdf
7. Pedroza, A. *Producción de amilasa termoestable a partir de Thermus sp.* (Tesis de maestría).1999. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.

TRATAMIENTO ORGÁNICO DEL TIZÓN DE HALO EN PLANTAS DE FRIJOL COMÚN CON EXTRACTO DE CLAVO EN INVERNADERO

Erika Cecilia Gamero Posada, Inés Guadalupe Castro-Ayala,
Ixchel Abby Ortiz Sánchez*, Sonia Valdez Ortega, Mirka
Maily Acevedo Romero.

Instituto Tecnológico del Valle Del Guadiana, Dgo, México. e-mail: ixchel_abby@hotmail.com

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante para el consumo humano en el mundo. Durango ocupa el segundo lugar en volumen de la producción de frijol con un 11.6%. El tizón de halo (TH) causado por *Pseudomonas syringae*, es una enfermedad que provoca la defoliación prematura y puede llegar a causar la muerte de plantas jóvenes, lo que conduce a rendimientos bajos e inestables. El tratamiento orgánico de plagas y enfermedades de cultivos representa una alternativa viable para reducir los costos y contaminación ambiental derivados del control químico. Extractos de clavo (*Syzygium aromaticum*) presentan propiedades antibacterianas contra patógenos de alimentos, incluido *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. El objetivo fue evaluar bajo condiciones de invernadero, la efectividad del extracto acuoso (EA) de clavo para tratar el TH de frijol común producido en el año 2017 en Canatlán, Durango. El EA se obtuvo por destilación con arrastre de vapor. Semillas de frijol variedad Pinto Saltillo infectadas con TH se sembraron en macetas y entonces se probaron 3 dosis de EA (4, 6 y 8 mL), un control negativo (tratamiento con hipoclorito de sodio) y un control positivo (tratamiento con agua). La variable dependiente evaluada fue la altura de planta a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 DDS. El análisis de varianza indicó que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$), y la prueba de diferencia de medias LSD Fisher ($\alpha=0.05$) muestra que la dosis de 4 mL de EA es la más eficiente, sin presentar sintomatología de TH.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante para el consumo humano en el mundo y ocupa el segundo lugar en importancia dentro de la superficie sembrada total a nivel nacional, sólo después del maíz (SAGARPA-a, 2015). Se ha convertido no sólo en un alimento tradicional, sino también en un elemento de identificación cultural, comparable con otros productos como el maíz y el chile, que son básicos para la dieta alimentaria de la población mexicana. Durango ocupa el segundo lugar en volumen de la producción de frijol con un 11.6% (SAGARPA-b, 2015).

En México el cultivo del frijol con frecuencia es atacado por enfermedades bacterianas como lo es el tizón halo, inducido por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, los cuales tienen una amplia distribución en las zonas productoras de esta leguminosa (Navarrete y Acosta, 2000). La enfermedad se desarrolla con temperaturas de 16 a 20 °C, humedad relativa alta (> 80%), lluvia y rocío. Provoca manchas circulares, con el centro necrosado rodeado por un halo amarillento verdoso. Posteriormente el área necrótica se rasga y cae, si las condiciones son favorables hay defoliación. La enfermedad puede desarrollarse de manera sistémica, los brotes nuevos muestran clorosis y la planta es de menor tamaño que las plantas sanas lo que puede llegar a causar la muerte de plantas jóvenes, lo que conduce a rendimientos bajos e inestables (Prudencio *et al*, 2008).

El control de enfermedades resulta difícil debido a la reducción de la diversidad genética en los frijoles comunes y la falta de bactericidas eficaces y ecológicos. Se requieren bactericidas orgánicos alternativos para el control biológico, con el fin de reducir los efectos de los patógenos en la producción de frijol común y los costos y contaminación derivados del control químico.

El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) es una especia ampliamente usada y conocida; su aceite esencial y extracto han sido analizados y caracterizados debido a que han demostrado tener amplio espectro de acción contra una gran cantidad de microorganismos causantes de distintos padecimientos que afectan a humanos, animales y plantas (Aguilar y Lopez, 2013). Varios trabajos demuestran el efecto inhibitorio del aceite o extractos de clavo sobre diversos grupos bacterianos y fúngicos, como el de Gamboa y Vásquez (2015), que plantean que la aplicación de aceite de clavo en mayor concentración tiene mayor efecto inhibitorio sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*; de igual manera se ha observado que extractos de clavo

presentan propiedades antibacteriales contra patógenos aislados de alimentos tales como *Pseudomonas aeruginosa* (Pandey y Singh, 2011) y *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Akhtar, 1997). Ibarra *et al.* (2017) demostraron que el aceite esencial de *S. aromaticum*, así como el extracto acuoso, presentan una significativa actividad inhibitoria sobre *X. campestris* y *P. syringae* de frijol común, en condiciones de laboratorio sobre agar nutritivo. Es por eso que en este trabajo se tuvo el especial interés de evaluar bajo condiciones de invernadero, sobre plantas de frijol común, la efectividad del extracto acuoso de clavo para tratar el tizón de halo.

TEORÍA

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo tradicional que los productores duranguenses consideran como alimento básico, fuente de ingresos y complemento forrajero para animales domésticos (Rosales *et al.*, 2009); es uno de los principales cultivos en el Estado de Durango, habiéndose sembrado de 2010 a 2016 un promedio anual de 242,084 ha con una producción promedio de 1,159 ha anual (SIAP, 2017). Se considera que cada mexicano consume anualmente entre 12.6 y 15 kg de frijol (Rosales *et al.*, 2009), lo que genera una demanda aproximada de 1.6 millones de toneladas anuales. En la actualidad se observa una tendencia negativa en el consumo del frijol y algunos autores muestran cifras inferiores a 10 kg por persona al año. Lo anterior, se ha relacionado con la carencia de opciones de consumo y el incremento de casos de diabetes, hipertensión y cáncer.

Las áreas más importantes para la producción de frijol de riego en el Estado, se encuentran por orden de importancia y superficie de siembra en los municipios: Nombre de Dios, Poanas, Vicente Guerrero y Durango, que suman el 90% del total de la superficie en esta condición de humedad (SAGARPA, 2015-a). Uno de los factores que afectan la calidad comercial del grano de frijol en estas localidades, son las enfermedades provocadas por hongos y bacterias. Las enfermedades causadas por hongos patógenos más comunes en frijol son antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), roya (*Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*). Las enfermedades bacterianas son: tizón de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) y tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) (Rosales *et al.*, 2009). Estas enfermedades son transmitidas en la parte interna y externa de la semilla, especialmente tizón común, el cual puede ocasionar hasta 40% de pérdidas de rendimiento (Akhavan *et al.*, 2013). Las variedades mejoradas liberadas recientemente muestran tolerancia a antracnosis y roya, pero no al tizón común y tizón de halo.

El organismo responsable del tizón de halo es una bacteria conocida como *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y constituye un serio problema en todo el mundo, especialmente donde las temperaturas son moderadas y existen antecedentes de la presencia severa de la enfermedad. Se han reportado pérdidas en rendimiento de 23 hasta 43% en algunos lugares de Estados Unidos de América. La bacteria puede afectar hojas, tallo, vainas y la semilla. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen como pequeñas manchas aguanosas en las hojas. En clima muy seco estas manchas toman una coloración bronceada y mueren. Alrededor de esas manchas se desarrolla un ancho halo de color verde amarillento y aspecto grasoso, de donde la enfermedad toma su nombre. Esta característica no se manifiesta si la temperatura es demasiado alta. Si la infección procede a través del tejido vascular las hojas jóvenes se doblan hacia abajo y toman una coloración amarillenta aún sin que las características manchas rodeadas por el halo estén presentes. Cuando la enfermedad es muy severa toda la planta manifiesta clorosis. El aspecto grasoso de las lesiones bacterianas se debe al exudado bacteriano de aspecto cremoso que al salir de la lesión puede ser dispersado hacia plantas sanas. Los síntomas en las vainas consisten en manchas de color rojo o café o franjas del mismo color en la sutura de la vaina que pueden tener un aspecto aguanoso. Al madurar las vainas el color verde de las lesiones no desaparece y el exudado bacteriano en la superficie de la lesión toma el aspecto de una costra. El grano en formación en esas vainas puede pudrirse o “chuparse” y decolorarse. El número de granos dañados es mayor cuando la enfermedad se presenta desde que la vaina principia a formarse. Si la enfermedad ocurre a partir de semilla contaminada, las plántulas pueden sufrir estrangulamiento del tallo arriba del nudo cotiledonar durante las primeras etapas de desarrollo del cultivo. La enfermedad puede originarse a partir de semilla contaminada o provenir de los residuos de plantas infectadas que permanecen sobre la superficie del suelo. La bacteria es capaz de sobrevivir por nueve meses después de que los residuos infectados pasaron a través del tracto digestivo de borregos. La bacteria invade la planta a través de

heridas o aberturas naturales especialmente en periodos con alta humedad relativa o con la presencia de una capa de agua. Una vez en la planta la bacteria se dispersa a otras por medio del golpeteo de las gotas de lluvia o arrastrada por el viento durante periodos de lluvia. Las temperaturas frescas (entre 18 y 22 °C) inducen la producción de una toxina que es la responsable de la formación del halo y amarillamiento característicos de la enfermedad. Bastan únicamente 12 semillas contaminadas en una hectárea para iniciar una epidemia. Si la temperatura se incrementa algunos síntomas podrán no observarse, como en el caso del halo que no se manifiesta si la temperatura es mayor de 28 °C aunque pequeñas lesiones aguanosas seguirán presentes.

El control químico de las plagas y enfermedades, es uno de los métodos más efectivos que posee el hombre para defenderse de estos enemigos, debido a que produce beneficios a corto plazo. Sin embargo, este método de lucha aplicado indiscriminadamente, por su efecto acumulativo provoca diversos impactos tales como desbalance ecológico, contaminación ambiental, que han impactado negativamente en la biodiversidad de los agro ecosistemas, intoxicaciones y daños severos a la salud humana, por solo citar algunos (Hernández, 2004).

Una de las alternativas al control químico es el uso de biocontroladores a base de extractos vegetales, siendo los aceites esenciales los más estudiados, como es el caso de aceites esencial de canela y clavo, que se han propuesto como fuertes agentes antifúngicos en la post cosecha de plátano (Ranasinghe *et al.*, 2002). Saeed y Tariq (2008) probaron el aceite esencial de clavo, así como su infusión acuosa y cocimiento, contra 100 aislados de diez bacterias bacilos Gram negativos, probando que la infusión acuosa y la cocción de clavo tienen la máxima actividad inhibitoria con *Pseudomonas aeruginosa*; el aceite esencial de clavo mostró inhibir fuertemente a *Vibrio cholerae*. Por otra parte, Ibarra *et al.* (2017) demostraron que el extracto acuoso de *S. aromaticum*, así como el aceite esencial, presentan una significativa actividad inhibitoria sobre *X. campestris* y *P. syringae* de frijol común, en condiciones de laboratorio sobre agar nutritivo. Por este motivo se cree que existen altas posibilidades que el extracto acuoso de clavo actúe eficazmente sobre el tizón de halo presente en plantas de frijol común, permitiendo así, que completen su ciclo de vida manteniendo su productividad.

El análisis químico del aceite esencial de clavo indica que el principal componente es el eugenol (más del 80%), responsable del olor característico de esta especie y de su actividad antimicrobiana, así como los fenilpropanoides tales como el carvacol, timol y cinamaldehida (Chaieb *et al.*, 2007). Por otro lado, la fase acuosa contiene taninos hidrofílicos con grupo tergaloil (telimagrandin II, rugosin F y escuarrosanin A) que mostraron actividad antifúngica contra cepas de *Cándida* en los ensayos de Bao *et al.* (2012).

La alternativa que se propone en este trabajo es la utilización de controladores de origen natural como lo son los extractos vegetales, siendo los extractos de hierbas de olor los que demuestran ser muy eficientes contra agentes bacterianos y fúngicos, tal es el caso del extracto acuoso de *S. aromaticum*.

PARTE EXPERIMENTAL

Los trabajos de fueron llevados a cabo en Agosto-Diciembre de 2017, en el Laboratorio de Agroquímica del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana y en uno de los invernaderos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, campus Durango. Para evaluar estadísticamente el efecto del extracto acuoso de *S. aromaticum* sobre plantas de frijol común infectadas son tizón de halo (*P. syringae*), se utilizó un área experimental conformada por 18 macetas, donde la unidad experimental fue la maceta. El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con arreglo factorial 6*6, con 3 repeticiones por tratamiento. En el cuadro 1 se describen los factores y niveles de los tratamientos. Y en este reporte únicamente se mostrarán resultados de una variable dependiente analizada (altura de la planta).

Cuadro 1. Tratamientos *in situ*.

Factor	Nivel	Variable Dependiente
Facto A: Dosis de Extracto	4 mL	Altura de planta (cm)
	6 mL	
	8 mL	
	Control positivo (tratamiento con agua)	
	Testigo sin infectar	
Facto B: Etapa de crecimiento	Control negativo (tratamiento con hipoclorito de sodio)	Altura de planta (cm)
	Hojas primarias (7-11 DDS)	
	Primera hoja trifoliada (11-16 DDS)	
	Tercera hoja trifoliada (16- 23 DDS)	
	Prefloración (23-32 DDS)	
	Floración (32-36 DDS)	
Formación de vainas (44-64 DDS)		

(DDS= días después de la siembra)

La cepa utilizada en este trabajo fue aislada de semillas de frijol Pinto Saltillo que fue producida en el municipio Canatlán, Durango en 2017, que presentaba signos claros de tizón de halo. Muestras de 10 g de semilla fueron selladas en la región hilar utilizando pegamento a base de cianoacrilato. Las semillas se desinfectaron usando una solución de hipoclorito de sodio al 2%, en agitación constante durante 3 min y luego enjuagadas con agua destilada estéril. En condiciones asépticas, las semillas secas fueron molidas en 90 mL de buffer de fosfatos en una licuadora doméstica durante 1 min, para liberar al patógeno de los tejidos de la semilla. La bacteria se aisló por medio de diluciones seriadas decimales, que luego fueron sembradas sobre B-King por la técnica de extensión en superficie. La incubación se llevó a cabo a 30°C por 48 h. Los aislados fueron confirmados considerando la morfología colonial, morfología microscópica, metabolismo y una curva de crecimiento por espectrofotometría a 660nm.

Posteriormente, la bacteria se creció sobre agar nutritivo por la técnica de agotamiento y se cosechó raspando el medio con una varilla de vidrio en "L" y buffer de fosfatos, la suspensión bacteriana se colocó dentro de un tubo estéril con tapa.

Para la obtención de extractos *S. aromaticum* se empleó la técnica de destilación por arrastre de vapor, utilizando 250 g de materia seca triturada en 3 L de agua destilada, dentro de una olla de presión doméstica con capacidad para 4 L. La destilación se llevó a cabo durante 2 h luego de iniciada la ebullición, empleando una plancha calefactora a 350 °C. Enseguida se colocó el extracto en un matraz de separación, y luego de 12 h en reposo y en obscuridad se obtuvieron el aceite esencial y el extracto acuoso, ambos se almacenaron a 4°C en recipientes color ámbar.

Para la infección de plantas de frijol, se utilizaron semillas de la misma variedad, que fueron embebidas en una suspensión de *P. syringae*, con una concentración 1×10^6 durante 10 minutos con agitación constante. Las semillas infestadas se dejaron remojando en las diferentes dosis de tratamientos por 30 min y luego secadas al aire libre por 24 h. Enseguida las semillas se sembraron a 5 cm de profundidad en macetas de plástico, utilizando como sustrato pet moss. Se realizó una aplicación de fertilización química con la dosis de 35-50-00 (N-P₂O₅-K₂O) a las 10 DDS.

El extracto acuoso de clavo se aplicó de manera manual, directamente a la raíz de la planta, en cada una de las etapas de crecimiento del cultivo, mostradas en el Cuadro 1. Se utilizaron 3 dosis del extracto de clavo (4, 6 y 8 mL), así como un control negativo (semilla infectada tratada con hipoclorito de sodio al 5%), un control positivo (semilla infectada tratada con agua), y un testigo sin infectar.

Las variables dependientes se evaluaron de acuerdo al desarrollo del cultivo. En este caso se mostrarán resultados sobre la altura de planta a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días después de la siembra (DDS). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$), se realizaron comparaciones de medias usando la prueba de Fisher ($\alpha=0.05$). Ambos procedimientos se realizaron utilizando el paquete InfoStat®.

RESULTADOS

En el Cuadro 2 se muestra el análisis de varianza de los datos obtenidos (altura de la planta), luego de la aplicación de las diferentes dosis de extracto acuoso de clavo, sobre plantas de frijol común infectadas con tizón de halo, a los 42 días de desarrollo. Se observa que existe diferencia significativa entre los niveles del factor A, es decir, entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). La prueba de comparación de medias de Fisher ($\alpha=0.05$), indica que las plantas enfermas con tizón de halo, y que fueron tratadas con 4 mL de extracto acuoso de clavo, en cada una de sus etapas de crecimiento, mostraron una mayor altura, aunado a un crecimiento vigoroso observados (Figura 1). Este tratamiento no mostró diferencia significativa con respecto al testigo sin infectar y al control negativo, es decir, las plantas enfermas tratadas con 4 mL de extracto de clavo, muestran un crecimiento igual al de plantas no enfermas. A diferencia de lo anterior, las plantas enfermas tratadas con 8 y con 6 mL de extracto de clavo muestran un crecimiento igual al de plantas enfermas (control positivo).

Cuadro 2. Altura de plantas de frijol común, variedad Pinto Saltillo, infectadas con tizón de halo y tratadas con diferentes dosis de extracto acuoso de clavo de olor.

Factor	Nivel	Altura de la Planta (cm)	
A Dosis de Extracto	Control negativo	18.82	a
	Testigo sin infectar	18.29	a b
	4 mL	15.18	a b
	Control positivo	10.51	b c d
	8 mL	7.87	c d
	6 mL	6.45	d
B DDS	42	34.86	a
	28	13.37	b
	35	11.33	b
	21	8.01	b c
	14	7.40	b c
	7	2.17	c
A*B		ns	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). ns= no significativo

Era de esperarse que a mayor dosis de extracto de clavo, mejor sería el desarrollo de las plantas, atribuyéndoselo a que el tratamiento contrarrestaba de manera más eficaz a la enfermedad, sin embargo esto no ocurrió, posiblemente porque altas concentraciones de extracto de clavo tengan un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las plantas (Figura 1), aunque la enfermedad estaba ausente.

El análisis químico del aceite esencial de clavo indica que el principal componente es el eugenol (más del 80%), responsable del olor característico de esta especia y de su actividad antimicrobiana, así como los fenilpropanoides tales como el carvacol, timol y cinamaldehida (Chaieb y col., 2007). Sin embargo, los resultados de *Ibarra et. al.* y los del presente trabajo, indican que alguno de los componentes no miscibles en el aceite esencial y que permanece en la fase acuosa, como es el caso de algunos taninos hidrofílicos con grupo tergaloil (telimagrandin II, rugosin F y escuarrosanin A) (Bao *et. al.*, 2012), es el que posiblemente esté actuando como antimicrobiano de manera más efectiva contra *P. syringae*, pero que en alta concentración tiene una interacción negativa con la planta, inhibiendo su total potencial de crecimiento, por lo que sería de gran interés realizar un análisis de composición química del extracto acuoso, así como pruebas de inhibición de la viabilidad del patógeno con los componentes aislados.

CONCLUSIONES

La aplicación de extracto de clavo sobre plantas de frijol común con signos evidentes de tizón de halo, permitió que las plantas completaran su ciclo de vida con una mayor altura y vigorosidad, presentando vainas en buen estado. Esto es atribuible a los componentes antibacterianos presentes en el extracto acuoso de clavo, que inhibieron el desarrollo y propagación de *P. syringae*. La dosis más efectiva de extracto acuoso de clavo fue la de 4 mL por planta, en cada fase de desarrollo del

frijol. Se observó que dosis mayores detienen el crecimiento de las plantas o incluso causan la aparición de signos de necrosis. Se propone, el uso de extracto acuoso de clavo de olor en el cultivo de frijol, para minimizar el efecto de las bacterias del tizón de halo, en conjunto con otras actividades culturales, ayudando así a reducir los costos y el impacto ambiental negativo por el uso excesivo de agroquímicos.

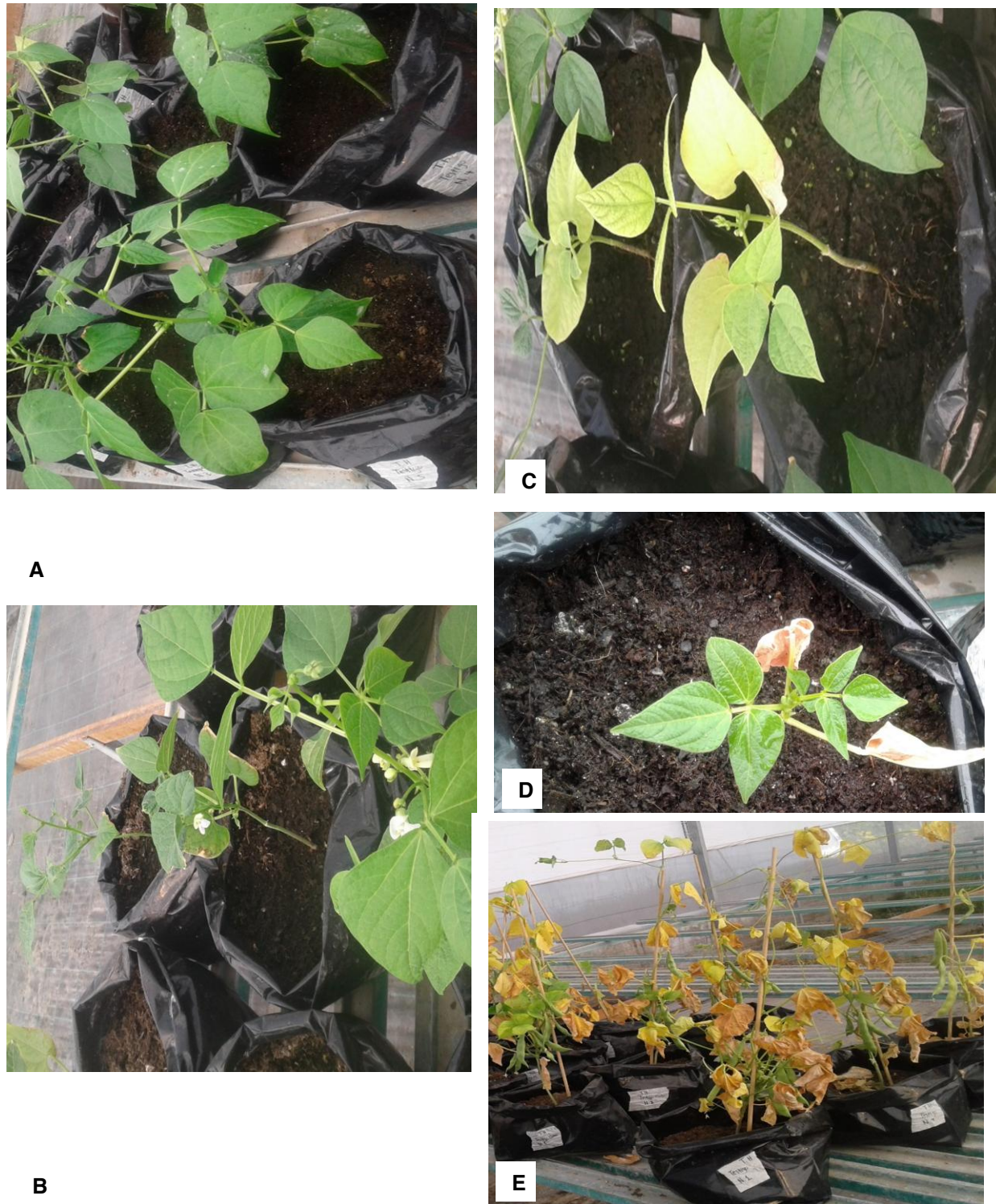


Figura 2. Plantas de frijol común bajo condiciones de invernadero de 28 DDS. A) Control Negativo y Testigo sin Infectar. B) Tratamiento con 4 mL de EA de clavo. C) Tratamiento con 6 mL de EA. D) tratamiento con 8 mL de EA. E) Control Positivo de 42 DDS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar Gonzalez, A. E., & Lopez Malo, A. "Extracto y aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicacion como agentes antimicrobianos en alimentos". *Temas selectos de Ingenieria de Alimentos*, 2013. 7(2), pp. 35- 41.
2. Akhavan, A.; Bahar, M.; Askarian, H.; Lak, M.R.; Nazemi, A.; and Zamani, Z. "Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices". Springer. 2013. Plus 2:41.
3. Akhtar, M. A.; Rahber-Bhatti, M. H.; Aslam, M. "Antibacterial activity of plant diffusate against *Xanthomonas campestris* pv. citri". *International Journal of Pest Management*. 1997. Volumen 43. P. p. 149-153
4. Bao, L. M.; Eerdunbayaer; Nozaki A.; Takahashi, E.; Okamoto, K.; Ito, H.; Hatano, T. "Hydrolysable Tannins Isolated From *Syzygium aromaticum*: Structure Of A New C-Glucosidic Ellagitannin And Spectral Features Of Tannins With A Tergalloyl Group". *HETEROCYCLES*. 2012. Vol. 85, No. 2, 2012, pp. 365 - 381.
5. Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. "The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review". *Phytotherapy Research*. 2007. Vol. 1. Issue 6. P.p. 501-506.
6. Gamboa Anticona, J., & Vasquez Valles, M. "Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de Salmonella". *Revista Científica de Estudiantes*, 2015. 1(3), pp. 42 51.
7. Hernández F., V. M. "Efectividad Biológica "in vitro" de Extractos Vegetales para el Control de Hongos Fitopatogenos". Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. 2004. P.p. 4-9.
8. Ibarra Luna, J. A., Núñez Zavala, M. I., Gamero Posada, E. C., Ortiz Sánchez, I. A., Acevedo Romero, M. M. "Evaluación del Efecto de Extractos de *Syzygium aromaticum* sobre la viabilidad de Tizón Común y Tizón de Halo De *Phaseolus vulgaris* L.". 29 semana Internacional de Agronomía. 2017. P.p. 404-411.
9. Navarrete Maya, R., & Acosta Gallegos, J. A. "Resistencia de frijol al tizon de halo en el Valle de Mexico y progreso de la enfermedad". *Revista Fitotecnica Mexicana*, (2000). 23(2), PP. 17-28.
10. Pandey, A. and P. Singh. "Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens". *Asian Journal of Plant Science and Research* 2011. 1(2):69-80.
11. Prudencio Sains, P., Navarrete Maya, R., Navarrete Maya, J., & Acosta Gallegos, J. A. (). "DINÁMICA DE LOS TIZONES COMÚN Y DE HALO DEL FRIJOL EN EL VALLE DE MÉXICO". *Agricultura Tecnica en Mexico*. 2008. 34(2), pp. 201-212.
12. Ranasinghe. L.; Jayawardena B.; Abeywickrama K. "Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana". *Letters in Applied Microbiology*, 2002. 35, 208–211
13. Rosales S., R.; Acosta G., J. A.; Ibarra P., F. J.; Cuéllar R., E. I.; Nava B., C. A. "Validación de Variedades y Líneas Mejoradas de Frijol en Durango". Publicación Especial No. 27. INIFAP. Campo Experimental Valle del Guadiana, Durango, México. 2009.P. p. 6-12
14. Saeed, S. and Tariq, P. "In Vitro Antibacterial Activity ff Clove Against Gram Negative Bacteria".. *Pak. J. Bot.*, 2008, 40(5): 2157-2160
15. SAGARPA-a. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). "Agenda Técnica Agrícola de Durango. Segunda Edición. México". 2015. P. p. 63-70.
16. SAGARPA-b. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). "Propuesta de estructuras tipo para la organización de conglomerados productivos y comerciales, integrados por pequeños productores de frijol con empresas integradoras". 2015. P.p.

-
17. SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017. <http://www.siap.gob.mx/>. Consultado en Junio de 2017.

PRÁCTICAS AGROECOLÓGICAS EN REGIONES PRIORITARIAS PARA LA CONSERVACIÓN: SIERRA DEL ABRA TANCHIPA Y SIERRA DE XILITLA

Díaz-Otálora, Laura; Aguilar-Benítez, Gisela¹; Raedig, Claudia²; Castro- Rivera Rigoberto³, Jarquín-Galvez, Ramón¹.

¹Instituto de Investigación de Zonas Desérticas - Universidad Autónoma de San Luis Potosí, ²ITT-Cologne University of Applied Sciences, ³ Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada - Instituto Politécnico Nacional

RESUMEN

La “Reserva de la Biósfera Sierra del Abra Tanchipa” y la “Sierra de Xilitla” ubicadas en la Huasteca Potosina son regiones prioritarias para la conservación de la biodiversidad, sin embargo, poco se ha sistematizado en relación a las prácticas agrícolas que se desarrollan en su zona de influencia. El objetivo de la investigación fue caracterizar los sistemas de producción familiar e identificar las prácticas agroecológicas que impactan en la conservación de los recursos naturales. Se utilizó una metodología de acercamiento-acompañamiento y se identificaron las prácticas agroecológicas a partir de un modelo cuantitativo. Se reconocieron 13 prácticas agroecológicas en los sistemas estudiados, destacaron el uso de semillas locales y el mantenimiento de la agrobiodiversidad. El análisis permitió reconocer el valor del conocimiento de los campesinos y se identificaron algunos factores críticos para mantener las prácticas agroecológicas como la transmisión del conocimiento campesino, la cohesión familiar, escenarios de cooperación comunitaria, presencia institucional, el origen de las comunidades y su objetivo de producción. Se observó un gradiente entre prácticas agroecológicas e influencia de las políticas que incentivan la producción comercial de monocultivos. Se identificaron cambios en las dinámicas productivas regionales y baja participación de jóvenes y niños en actividades agrícolas familiares. Existen algunas debilidades que atender para incrementar el nivel de vida de los productores de autoconsumo que son quienes mayor número de prácticas agroecológicas realizan; sin embargo, los resultados evidencian que las acciones prioritarias para la conservación de la biodiversidad pueden tener como socios potenciales a los productores que mantienen prácticas agroecológicas por convicción de los efectos benéficos a su entorno.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de la biodiversidad, de los recursos naturales y el detrimento de la calidad ambiental de los ecosistemas junto con la transformación y contaminación de los ecosistemas, son problemáticas que han despertado el interés de la humanidad moderna para generar mecanismos para evitar mayores pérdidas y de mitigar los daños ya causados. Se ha evidenciado la necesidad de replantear y cuestionar el desarrollo de las actividades humanas teniendo en cuenta que muchos de los problemas ambientales actuales son causados, acelerados o incrementados por el mal manejo de los recursos naturales (Martínez-Corona 2012). Adicionalmente, la sociedad ha identificado que existe una obligación moral del ser humano en el uso de recursos y en la relación que establece con los demás elementos que componen su entorno (Singer 1995).

Uno de los enfoques para la conservación de la biodiversidad se ha basado en la escala del paisaje, demarcando áreas o espacios protegidos en donde se establecen una serie de restricciones en el uso del suelo, que limitan el aprovechamiento y transformación de los ecosistemas existentes en áreas con alta biodiversidad (Margules & Pressey 2000; Fandiño-lozano & Wyngaarden 2012; Armendáriz-Villegas *et al.* 2015). También se ha determinado la necesidad de generar conectividad entre estos espacios de conservación (Hansen & DeFries 2007) teniendo en cuenta la importancia de la matriz (Perfecto *et al.* 2009).

La conservación de la biodiversidad en espacios naturales denominados áreas protegidas, en donde los usos del suelo se restringen en función de permitir la existencia de especies y ecosistemas en estado silvestre, es una estrategia de planificación que debe ser acompañada por mecanismos de gestión teniendo en cuenta que los territorios protegidos no se comportan como islas sino que son espacios inmersos en una matriz y su bienestar depende del estado de la matriz en la cual se encuentran inmersos (Perfecto *et al.* 2009). Las regiones prioritarias para la conservación representan un reto a nivel de gestión y manejo porque deben ser escenarios de articulación y

construcción social que sirvan para validar la decisión de conservación de forma que se fortalezcan las relaciones armónicas entre las comunidades cercanas y el entorno.

En la Huasteca Potosina, la CONANP reconoce dos regiones prioritarias para la conservación; la Reserva de la Biósfera Sierra del Abra Tanchipa (declarada como área protegida federal) y la Región de Xilitla (en proceso de declaratoria dentro de alguna categoría de protección). En estas dos regiones se implementa una serie de esfuerzos que van encaminados hacia la conservación y hacia el apoyo de las comunidades vecinas de forma que tales comunidades se conviertan en aliadas de los procesos de conservación y con sus actividades puedan apoyar el mejor desarrollo de los objetivos de conservación por medio del desarrollo de actividades sostenibles (CONANP & GIZ 2013).

Las dos regiones prioritarias anteriormente citadas se encuentran inmersas en una matriz con actividad agrícola predominante, por lo que las comunidades aliadas dependen del desarrollo de las actividades agropecuarias para su subsistencia. De esta forma, las decisiones encaminadas a armonizar las relaciones de sostenibilidad deben abordar las necesidades de producción agrícola de forma que se logre conectar a los objetivos de conservación con la cotidianidad humana de los actores. Aun cuando en las regiones prioritarias se han realizado diversos estudios florísticos y faunísticos, y el plan de manejo establece la necesidad de "Elaborar un diagnóstico de las actividades productivas tradicionales de la reserva de la biosfera y su zona de influencia", actualmente no se ha realizado un diagnóstico completo para conocer el estado de los sistemas de producción agrícola (CONANP, 2012).

Debido a que no se cuenta con un diagnóstico de las actividades productivas, tampoco se tienen referentes de las prácticas de manejo ni del conocimiento local, esto imposibilita la generación de alternativas de desarrollo sostenible que sean aplicables, específicas y coherentes con el territorio y con la conservación; la situación antes descrita hace evidente la necesidad de generar avances en el diagnóstico de los sistemas productivos.

Un enfoque pertinente para el diagnóstico de las prácticas agrícolas es el enfoque que identifica a las prácticas agroecológicas como aquellas prácticas productivas congruentes con la conservación de los recursos naturales y los elementos generales de un ecosistema. La labor de identificar las prácticas agroecológicas en las regiones prioritarias para la conservación en la Huasteca Potosina requiere el desarrollo de una metodología de evaluación específica teniendo en cuenta que actualmente no existe ningún modelo de valoración de prácticas agroecológicas que sea aplicable a las condiciones de las áreas protegidas. Por tal motivo, para la presente investigación se desarrollará una metodología integral que a través de un diagnóstico participativo y el cotejo con criterios de definición de prácticas agroecológicas permita caracterizar las prácticas agrícolas de los sistemas productivos familiares de autoconsumo de la matriz de conservación de las regiones prioritarias para la conservación.

TEORÍA

La perspectiva agroecológica proporciona un marco metodológico coherente con conservación de la biodiversidad (incluso en términos del mantenimiento de especies silvestres identificando el papel de polinizadores o comunidades migratorias cuyos patrones de movimiento dependen de patrones del paisaje) (Perfecto *et al.* 2009).

La biodiversidad agrícola se refiere en el más profundo sentido de los recursos genéticos que proporciona a la humanidad alimentos, ropa y medicinas. La biodiversidad agrícola constituye un almacén y un elemento esencial en el desarrollo de la agricultura sostenible y la seguridad alimentaria en todo el mundo. Es reflejo del complejo proceso evolutivo de la selección y domesticación que refleja fuertes interacciones entre las diferentes culturas y la gestión de los recursos naturales (Shiva 2013; Harris 1989). La agroecología va más allá por una visión unidimensional (relacionado con la genética, la agronomía, la ciencia de los suelos, etc.) a una mejor comprensión de los diferentes pisos ecológicos y sociales de la coevolución, la estructura y el funcionamiento de los sistemas (Altieri 1999). La biodiversidad agrícola es una de las bases que conduce a la comprensión o la mejora de los diferentes tipos de prácticas agrícolas y este concepto trasciende hacia la integración del paisaje como elementos fundamental para el manejo de un agroecosistema (Nicholls *et al.* 2016; Wezel *et al.* 2014).

De acuerdo a la “Estrategia Nacional sobre Biodiversidad en México”, la biodiversidad mexicana representa una parte importante de la identidad cultural, símbolo de arraigo y orgullo, vínculo con la madre Tierra y fuente de inspiración artística y espiritual; la biodiversidad ha sido la base del sustento material de los pueblos que desde la antigüedad desarrollaron una relación cultural íntima con la naturaleza, prueba de ello ha sido la historia y el desarrollo de los pueblos mesoamericanos cuya herencia queda en algunas comunidades que mantienen prácticas ancestrales en cuanto a los medios de apropiación de la biodiversidad junto con prácticas agrícolas y forestales tradicionales de bajo impacto ambiental. Dentro de la estrategia se cuenta con cuatro líneas estratégicas: 1. Protección y conservación, 2. Valoración de la Biodiversidad, 3: Conocimiento y manejo de la información y 4. Diversificación del uso. Dentro de la primera estratégica se habla de la “conservación *in situ*” especialmente relacionada con las áreas protegidas o espacios prioritarios para la conservación (Conabio 2000).

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron entrevistas a especialistas y conocedores del tema para obtener información sobre los lugares a los cuales se debía hacer un acercamiento más detallado. Inicialmente se realizaron 6 entrevistas a actores especializados (investigadores de la UASLP -Facultad de agronomía y el IIZD- y al Ingeniero Alejandro Durán Director de la Reserva de la Biosfera Sierra del Abra Tanchipa - CONANP).

A partir de la información suministrada por los especialistas y la información recabada en una primera salida de campo de reconocimiento, se diferenciaron algunas comunidades en donde se identificaron actividades agrícolas sostenibles con un énfasis en agricultura familiar de autoconsumo. Se dio prioridad a los sistemas familiares de autoconsumo teniendo en cuenta que tales tipos de sistemas productivos son los más tradicionales en la zona de estudio y son los que conservan prácticas costumbristas de producción.

Para la caracterización de los sistemas productivos familiares de autoconsumo se realizaron 25 entrevistas estructuradas a distintos actores de las comunidades y en cada comunidad se dio seguimiento y acompañamiento a 6 unidades familiares con actividades productivas de autoconsumo. Para la caracterización del manejo de sistemas productivos, Colín y colaboradores (2012) sugieren entrevistas abiertas y participación directa en las actividades de operación de la unidad productiva.

Las entrevistas de acercamiento-acompañamiento consistieron en visitar los espacios productivos familiares y desarrollar en conversaciones coloquiales los diferentes temas de las entrevistas, las preguntas del formato fueron hechas de forma directa e indirecta e incluso de distintas formas con el fin de obtener la mayor cantidad de información; también se hicieron observaciones con cuya información se fue completando el contenido de la entrevista.

A partir de la revisión de literatura se generó una matriz de evaluación en donde se organizaron una serie de criterios e indicadores. Para la consolidación de tal matriz de criterios se utilizaron como principal fuente de información tres artículos científicos que recopilan estos criterios de una forma clara: “Agroecological practices for sustainable agriculture. A review (Wezel *et al.*, 2014)”, “An indicator framework for assessing agroecosystem resilience (Cabel & Oelofse 2012)” y “Agroecology: Principles for the Conversion and Redesign of Farming Systems (Nicholls *et al.* 2016)”.

RESULTADOS

Se caracterizaron 18 sistemas productivos familiares de autoconsumo en las regiones prioritarias para la conservación, seis de ellos en la comunidad de La Aguaje en la zona de influencia de la Reserva de la Biósfera Sierra del Abra Tanchipa, otros seis en la comunidad Laguna del Mante en la misma reserva y otros seis en El Nacimiento II en la región prioritaria para la conservación en la Sierra de Xilitla. Las tres comunidades se encuentran en la zona del Corredor Biológico de la Sierra Madre Oriental en el estado de San Luis Potosí.

Se identificaron quince prácticas que son reconocidas claramente como prácticas agroecológicas por los criterios de evaluación de Nicholls, Altieri, & Vazquez, 2016; Wezel *et al.*, 2014 (Figura 1). De las quince prácticas, en campo se lograron identificar trece prácticas que son implementadas en los sistemas productivos analizados.

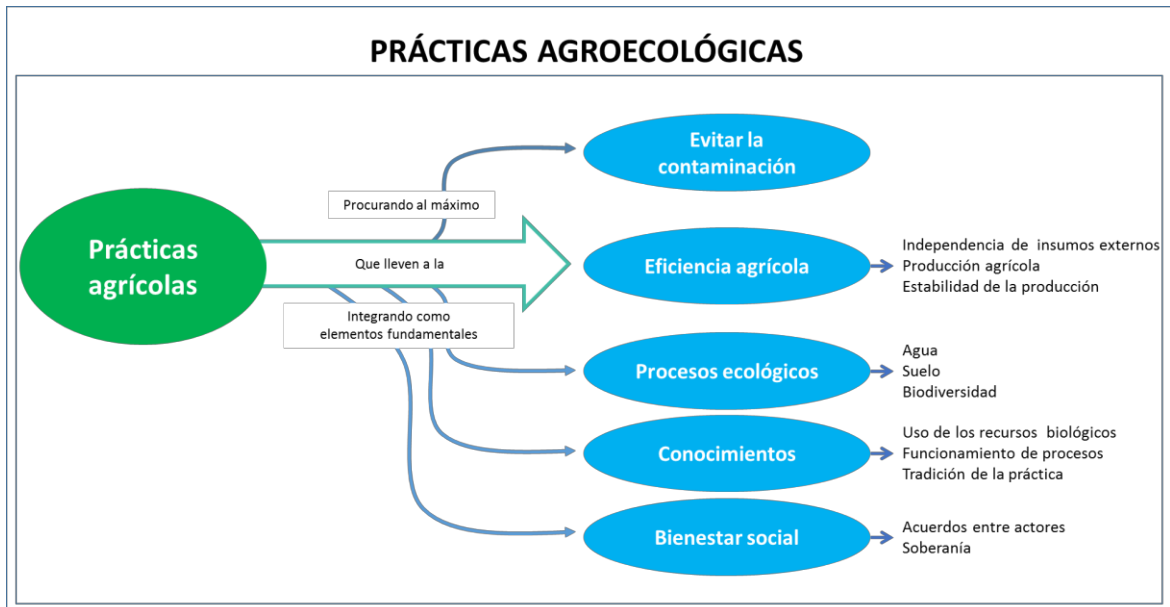


Figura 1. Representación esquemática de los criterios de la agroecología que definen las prácticas agroecológicas (Adaptado de los artículos de revisión de Nicholls et al (2016) y Wezel et al (2014).

En el Cuadro 1 se presentan los datos condensados de las prácticas tipificadas como agroecológicas y la frecuencia de su realización por comunidad. Se evidencia que, aunque el número de prácticas registradas en las tres comunidades de estudio es similar, la frecuencia con la que se realizan es diferencial. La comunidad La Aguaje sobresale en los resultados obtenidos.

PRÁCTICAS IDENTIFICADAS	ACTORES IDENTIFICADOS UTILIZANDO LA PRACTICA			
	LA AGUAJE	LAGUNA DEL MANTE	EL NACIMEINTO II	TOTAL
PRÁCTICAS AGROECOLÓGICAS (RECONOCIDAS COMO TALES)				
Selección de cultivares adaptados a las condiciones locales	6	6	6	18
Selección de plantas que promueven actividad en la rizósfera	6	5	5	16
Diversificación del sistema agrícola	6	2	6	14
Diversificación con plantas de cobertura	5	3	5	13
Diversificación con plantas leguminosas	6	5	5	16
Diversificación con plantas forestales (sistema agroforestal)	6	2	6	14
Pocas actividades de labranza	6	6	5	17
Integración de los elementos naturales del paisaje	6	2	6	14
Aplicación de abonos orgánicos en suelo	1	0	0	1
Uso de cercos vivos	6	3	6	15
Manejo de cultivos intercalados	3	1	6	10
Integración de animales al sistema productivo	6	1	2	9
Participación en actividades agrícolas comunitarias	6	1	6	13
PRÁCTICAS AGROECOLÓGICAS IDENTIFICADAS EN CADA COMUNIDAD	13	12	12	

CONCLUSIONES

En las comunidades de estudio se realizan prácticas agroecológicas que integran el conocimiento del entorno y las relaciones naturales.

Esta investigación permite la evaluación de prácticas agrícolas a la luz de indicadores que permiten la valoración de criterios agroecológicos en los sistemas productivos de áreas naturales protegidas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Altieri, M., 1999. *Agroecología bases científicas para una agricultura sustentable*, New York: Teca 20. Available at: <http://www.leisal.org/web/images/stories/revistapdf/vol22n2.pdf#page=30>.
2. Altieri, M. a & Nicholls, C.I., 2005. *Agroecology and the Search for a Truly Sustainable Agriculture*, PNUMA & University of California, Berkeley.
3. Armendáriz-Villegas, E.J. et al., 2015. Metal mining and natural protected areas in Mexico: Geographic overlaps and environmental implications. *Environmental Science & Policy*, 48, pp.9–19. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1462901114002445>.

4. Cabel, J.F. & Oelofse, M., 2012. An indicator framework for assessing agroecosystem resilience. *Ecology and Society*, 17(1).
5. Conabio, 2000. *Estrategia Nacional sobre Biodiversidad en México*, Comisión nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
6. CONANP, 2012. . (2012). *Programa de manejo de la Reserva de la Biósfera Sierra del Abra Tanchipa*. 1era ed., México D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT.
7. CONANP, 2015. Procodes. *Acciones y Programas Prioritarios*. Available at: <http://www.conanp.gob.mx/acciones/procodes.php>.
8. CONANP, 2014. PROGRAMA DE PAGO DE SERVICIOS AMBIENTALES EN ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS. *Acciones y Programas de Conservación*. Available at: <http://www.conanp.gob.mx/acciones/programa.php>.
9. CONANP & GIZ, 2013. *Programa de adaptación al cambio climático. Región Central de la Sierra Madre Oriental* 1era ed., México D.F.: CONANP.
10. Hansen, A.J. & DeFries, R., 2007. Ecological mechanisms linking protected areas to surrounding lands. *Ecological Applications*, 17(4), pp.974–988.
11. Lieskovský, J. et al., 2014. Factors affecting the persistence of traditional agricultural landscapes in slovakia during the collectivization of agriculture. *Landscape Ecology*, 29(5), pp.867–877.
12. Nicholls, C., Altieri, M. & Vazquez, L., 2016. Agroecology : Principles for the Conversion and Redesign of Farming Systems. *Journal of Ecosystems Ecography*, S5, pp.1–8.
13. Perfecto, I., Vandermeer, J. & Wright, A., 2009. *Nature's matrix: linking agriculture, conservation and food sovereignty*, London: Earthscan.
14. Rosset, P.M., 2015. *Social organization and process in bringing agroecology to scale*.
15. Saifi, B. & Drake, L., 2007. A coevolutionary model for promoting agricultural sustainability. , 65(1995).
16. Shiva, V., 2013. *The Law of the Seed*, www.navdanya.org/attachments/lawofseed.pdf: Navdanya International.
17. Singer, P., 1995. *Ética para vivir mejor*, Barcelona: Ariel.
18. Wezel, A. et al., 2009. Agroecology as a science, a movement and a practice. *Sustainable Agriculture*, 2, pp.27–43.

CRECIMIENTO DE FRIJOL INOCULADO CON RHIZOBIUM TROPICI CIAT899 EN PRESENCIA DE UNA PLANTA CON POTENCIAL ALELOPÁTICO

Paulina Janneth Pérez Peralta¹, Ronald Ferrera Cerrato¹, Alejandro Alarcón¹, Libia Iris Trejo Tellez¹ y María del Rocío Cruz Ortega²

¹Colegio de Postgraduados, ²Instituto de Ecología, UNAM.

RESUMEN

La Sociedad Internacional de Alelopatía define a la alelopatía como cualquier proceso que implica la síntesis de metabolitos secundarios producidos por las plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de los sistemas biológicos e incluso agrícolas. No obstante, poca atención ha recibido el potencial alelopático y su influencia en la simbiosis rizobio-leguminosa. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el potencial alelopático de *Ipomoea* en el crecimiento y nodulación de frijol en simbiosis por efecto de la incorporación de *Ipomoea* e inoculación de *R. tropici* CIAT899. En una cámara bioclimática se sembraron en agrolita estéril como sustrato las semillas de frijol (Flor de mayo); una vez germinadas se inocularon con *R. tropici* y se incorporaron las plantas de *Ipomoea* en los tratamientos requeridos. Al término de 30 días se evaluaron variables de crecimiento (altura, diámetro del tallo, volumen de radical, biomasa seca y área foliar) y se determinó el número biomasa y actividad nodular de las plantas de frijol inoculadas y con la incorporación de *Ipomoea*. En general, la inoculación con *R. tropici* beneficio las variables de crecimiento y la nodulación de las plantas de frijol, por el contrario, la incorporación de *Ipomoea* generó efectos negativos. Sin embargo, *R. tropici* disminuyó los efectos negativos de *Ipomoea* en el crecimiento de frijol; pero redujo su actividad nodular. Se sugiere que la simbiosis Rizobio-leguminosa es afectada por la presencia de plantas con potencial alelopático, no obstante, es importante realizar más estudios que nutran y corroboren sus efectos en el crecimiento vegetal, la respuesta fisiológica y nodulación de leguminosas en simbiosis con rizobios.

INTRODUCCIÓN

La alelopatía es un término acuñado inicialmente por Molisch en 1937, que se deriva de la palabra griega "allelon", que significa "recíproco", y "pathos" que es "sufrir", por lo que de forma literal expresa el sufrimiento recíproco entre dos organismos (Zohaib et al., 2016). No obstante, la Sociedad Internacional de Alelopatía, definió en 1996 a la alelopatía como cualquier proceso que implica la síntesis de metabolitos secundarios (MS) producidos por plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de los sistemas biológicos e incluso agrícolas (Torres et al., 1996). La fuente de aleloquímicos puede proceder de diversas partes de la planta y su liberación puede realizarse a través de: (a) lixiviación o lavado de las partes aéreas de la planta; (b) volatilización a través de las hojas; (c) liberación de compuestos de restos orgánicos por lixiviación o descomposición microbiana de los mismos (hojarasca o raíces muertas); y (d) exudación a través de las raíces (Anaya, 2003; Bertin et al., 2003; Jilani et al., 2008). La influencia de los aleloquímicos también es diversa e influyen en el establecimiento de las comunidades vegetales (Callaway y Ridenour, 2004; Fernández et al., 2016), afectan el estado nutrimental en el suelo (Jabran et al., 2013; Zhang et al., 2009), también, influyen en los procesos fisiológicos de las especies receptoras como la fotosíntesis (Weir et al., 2004), así como el establecimiento de las asociaciones entre planta-planta, y planta-microorganismos, por ejemplo con los hongos micorrízicos, bacterias fijadoras de nitrógeno y agentes patógenos en el suelo (Weston y Mathesius, 2013). Sin embargo, poca atención ha recibido la influencia que ejercen las plantas con potencial alelopático en la simbiosis rizobio-leguminosa.

TEORÍA

En la rizósfera, las raíces de las plantas secretan un conjunto de metabolitos primarios como ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos; así como, metabolitos secundarios tales como alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos (Berendsen et al., 2012; Venturi y Keel, 2016). A partir de éstos se pueden generar diversas interacciones, entre las que destaca la comunicación química entre plantas y organismos, interfiriendo en la señalización o afectando el establecimiento de una comunidad biótica. No obstante, dependiendo de la acción fitotóxica, la concentración bioactiva, la

persistencia y destino de los metabolitos secundarios en el entorno en que son liberados, pueden actuar como compuestos alelopáticos (Inderjit y Duke, 2003). Por su parte, los rizobios son un grupo de bacterias eficientes en la fijación del nitrógeno (N_2), por lo cual juegan uno de los papeles más importantes en la agricultura (Ferguson et al., 2010; van Hameren et al., 2013).

Los rizobios tienen la capacidad de establecer simbiosis con especies de leguminosas que incluyen más de 100 plantas de importancia agrícola (Masson-Boivin et al., 2009). Entre ellas, destacan *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común); una planta originaria de América y la tercera leguminosa más cultivada en el mundo (Rouhrazi et al., 2016) y que debido a su alta promiscuidad, *P. vulgaris* puede establecer simbiosis con las bacterias fijadoras de nitrógeno, tales como *Rhizobium etli*, *R. tropici*, *Sinorhizobium meliloti*, *S. americanum*, y *Bradyrhizobium* sp., entre otros (Rouhrazi et al., 2016).

PARTE EXPERIMENTAL

El experimento consistió de un diseño factorial 22; cuyos factores de estudio fueron: 1) inoculación bacteriana (con o sin inoculo), y 2) incorporación de Ipomoea (con o sin planta alelopática). Para cada leguminosa se consideraron cuatro tratamientos con doce repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. El análisis estadístico incluyó el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$). En todos los procedimientos se utilizó el programa SAS, versión 9.4. El establecimiento del experimento se realizó en la Unidad de Cámaras de Ambiente Controlado del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y se basó en lo propuesto por Rodríguez-Mendoza (1993) y consistió en ocupar como macetas recipientes de poliestireno (cap. 500 mL) los cuales se llenaron con agrolita estéril (121°C , 3 h) como sustrato. Las semillas de frijol (flor de mayo) se desinfectaron previamente con una solución 6% NaClO durante 3 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril por tres ocasiones. Al mismo tiempo de la siembra fue incorporada la plántula de Ipomoea de 1 mes de edad, en los tratamientos correspondientes. Una vez germinadas las semillas de frijol se realizó la inoculación de los tratamientos que así lo requerían, se adicionó 1 mL de inóculo por planta. El riego consistió en 20 mL de agua destilada estéril dos veces por semana, también se adicionaron a cada maceta, 20 mL de solución nutritiva Jensen una vez a la semana. Una vez transcurridos los 35 días de crecimiento, las plantas fueron cosechadas y se evaluó altura de la planta (con un flexómetro), diámetro del tallo (usando un vernier digital), volumen de la raíz (método de desplazamiento de volumen), área foliar (con el equipo LI-COR model 3100 USA) y el peso seco de la raíz y de la parte aérea (con una balanza analítica). Posteriormente, se colocaron bolsas de papel para su secado en estufa durante 72 h a 70°C . Después, se obtuvo la biomasa seca. Así mismo se contabilizaron los nódulos y se determinó su biomasa seca, así como la actividad nodular, la cual se evaluó mediante la determinación de actividad de la enzima nitrogenasa (EC 1.18.6.1), la cual se midió con la prueba de reducción de acetileno a etileno (C_2H_4). Cada una de las muestras se procesaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (Series II Gas Chromatograph, USA), con detector de ionizador de flama, para cuantificar el etileno.

RESULTADOS

Independientemente de la presencia de *I. purpurea*, la inoculación con *R. tropici* incrementó significativamente la altura, el volumen radical y la biomasa seca total de las plantas de frijol (tabla 1). En contraste, la incorporación de Ipomoea, redujo de manera significativa la altura y el volumen radical de las plantas de frijol (tabla 1), respecto al testigo. No se obtuvieron diferencias significativas en el diámetro de tallo, ni en el área foliar de plantas de frijol por efecto de la inoculación de *R. tropici* ni por efecto de la presencia de Ipomoea (tabla 1).

Tabla 1. Respuesta de crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. inoculado con *Rhizobium tropici* CIAT899, en presencia de *Ipomoea purpurea* L. Roth, después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado.

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Volumen radical (cm ³)	Biomasa seca total (mg)	Área foliar (cm ²)
Frijol No inoculado	14.0 ± 2,5 ab	2,2 ± 0,0 a	4,7 ± 0,2 ab	401,9 ± 32,7 b	26,9 ± 3,5 a
<i>R. tropici</i>	22,2 ± 4,7 a	2.2 ± 0,1 a	5,5 ± 0,5 a	536,0 ± 29,4 a	37,1 ± 5,3 a
Frijol + <i>I. purpurea</i> No inoculado	9,0 ± 0,7 b	2.6 ± 0,1 a	3,4 ± 0,2 b	410,9 ± 27,6 b	26,8 ± 2,9 a
<i>R. tropici</i>	10,9 ± 1,4 b	2.5 ± 0,1 a	4,5 ± 0,3 ab	435,3 ± 27,1 ab	31,7 ± 4,1 a

Valores con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$). Promedio \pm error estándar de la media. n = 12

La nodulación de las plantas inoculadas con *R. tropici* fue significativamente disminuida por *Ipomoea* (Figura 1A), cuya presencia resultó en un menor número de nódulos en la raíz; sin embargo, la biomasa seca nodular no mostró diferencias significativas con respecto a las plantas con la presencia de *Ipomoea* (Figura 1B). La actividad nitrogenasa del sistema radical de plantas de frijol fue inhibida significativamente por la presencia de *Ipomoea* (Figura 1C).

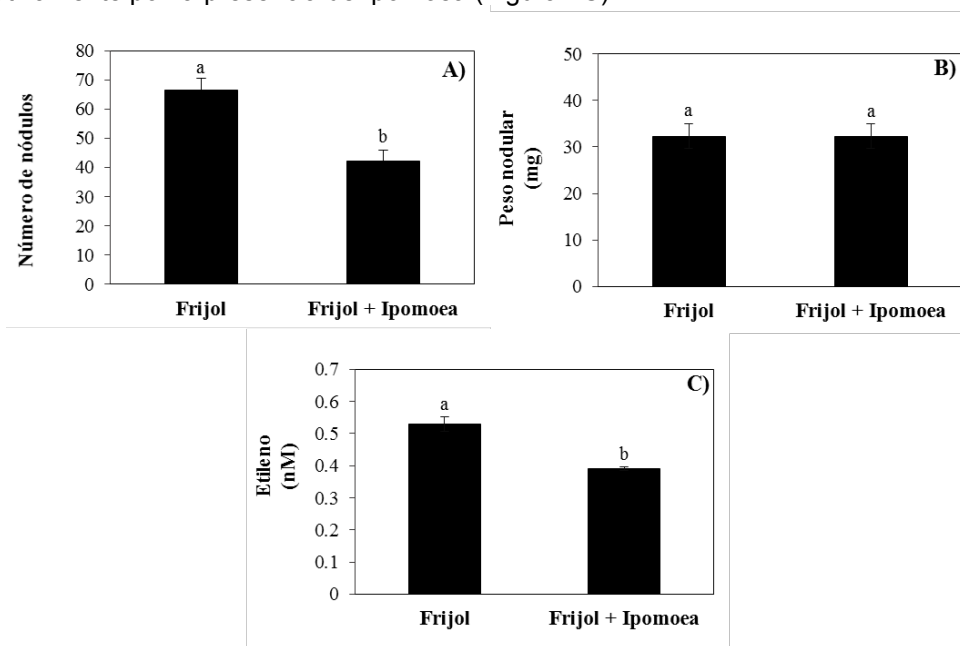


Figura 1. Número de nódulos (A), peso seco nodular (B) y cantidad de etileno reducido por acción de la enzima nitrogenasa (C) de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado. Medias \pm error estándar con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

CONCLUSIONES

En general, la inoculación con *R. tropici* mejoró el crecimiento de las plantas de frijol, en especial la altura, el volumen de la raíz, biomasa seca total. Asimismo, la incorporación de *Ipomoea purpurea* afecta negativamente el crecimiento de frijol, particularmente, altura, volumen de la raíz. Por su parte,

la nodulación es afectada de forma negativa; número de nódulos y actividad nitrogenasa por la incorporación de *I. purpurea* en plantas de frijol. En general, se sugiere que la presencia de *I. purpurea* a través de los exudados liberados por la raíz, afecta negativamente el crecimiento de frijol y que la inoculación con la bacteria simbiote puede reducir los efectos negativos que la planta alelopática le confiere. No obstante, es importante llevar a cabo más estudios que nutran y corroboren los efectos de plantas con potencial alelopático en el crecimiento vegetal y en la nodulación de leguminosas en simbiosis con rizobios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torres, R. M. Oliva, D. Castellano, P. Cross, *First World Congress on Allelopathy. A Science of the Future*, SAI (University of Cadiz, Cadiz, Spain). 1996, pp. 278.
2. Anaya, "Ecología Química". Instituto de Ecología, UNAM. México. 2003, pp. 1-33.
3. Zohaib, T. Abbas y T. Tabassum, "Weeds cause losses in field crops through Allelopathy", *Notulae Scientiae Biologicae*, Vol. 8,1, 2016, pp. 47-56.
4. B.J. Ferguson, A. Indrasumunar, S. Hayashi, M. Lin, Y. Lin, D. Reid, y P. Gresshoff, "Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation", *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol. 52,1, 2010, pp.61–76.
5. van Hameren, S. Hayashi, P. Gresshoff y B. Ferguson, "Advances in the identification of novel factors required in soybean nodulation, a process critical to sustainable agriculture and food security", *Journal of Plant Biology, Soil Health*, Vol. 1,1, 2013 pp. 6.
6. Bertin, X. Yang y L. A. Weston. "The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere", *Plant and Soil*, Vol. 256, 2003, pp. 67-83.
7. C.Fernández, Y. Monnier, M. Santoja, C. Gallet, L. A. Weston, B. Prévosto, A. Saunier, V. Baldy y A. Bousquet-Mélou, "The impact of competition and allelopathy on the trade-off between plant defense and growth in two contrasting tree species", *Frontier in Plant Science*, Vol. 7, 2016, pp. 594.
8. Masson-Boivin, "Small is plentiful", *Trends in Plant Science*, Vol. 1,3, 2016, pp. 173-175.
9. C.B. Zhang, J. Wang, B. Y. Qian y WH Li, "Effects of the invader *Solidago canadensis* on soil properties", *Applied Soil Ecology*, Vol. 43,2, 2009, pp. 163-169.
10. G. Jilani, S. Mahmood, A. N. Chaudhry, I. Hassan y M. Akram, "Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil" – a review, *Annals of Microbiology*, Vol. 58, 3, 2008, pp. 351-357.
11. K. Rhouhrazi, G. Khodakaramian y E. Velazquez, "Phylogenetic diversity of rhizobial species and symbiotes nodulating *Phaseolus vulgaris* in Iran", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 363, 2016, pp. 1-9.
12. L. A. Weston, U. Mathesius, "Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including Allelopathy", *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 39, 2013, pp. 283-297.
13. M. Jabran, M. Farooq, T. Aziz y K. H. M. Siddique. "Allelopathy and crop nutrition," in *Allelopathy. Current Trends and Future Applications* (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013), Chapter 14, pp. 337-348.
14. R. L. Berendsen, C. M. Pieterse y P. A. Bakker, "The rhizosphere microbiome and plant health", *Trends in Plant Science*, Vol. 17, 2012, pp. 478- 486.
15. R. M. Callaway, W. M. Ridenour, "Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability", *Frontiers in Ecology and the Environment*, Vol. 2,8, 2004, pp. 436-443.
16. S. Inderjit, S. O. Duke, "Ecophysiological aspects of allelopathy", *Planta*, Vol. 217, 2003, pp. 529-639.
17. T.L. Weir, S.W. Park y J.M. Vivanco, "Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals", *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 7, 2004, pp. 472–479.
18. V. Venturi, C. Keel, "Signaling in the rhizosphere", *Trends in Plant Science*, Vol. 21,3, 2016, pp. 187-198.

DESARROLLO DE CO-CRISTALES RICOS EN ANTIOXIDANTES NATURALES DE TÉ VERDE MATCHA USANDO EL MÉTODO DE NUCLEACIÓN ESPONTÁNEA

Rosaelena Suárez Montaña, Cesar Ignacio Beristáin Guevara, Maribel Jiménez Fernández*

Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Dr. Luis Castelazo Ayala s/n, Xalapa-Equez., Veracruz, CP. 91190, México. *maribjimenez@uv.mx

RESUMEN

Las hojas de *Camellia sinensis* (té verde Matcha) contienen compuestos fenólicos que poseen una alta actividad antioxidante. Sin embargo, estos presentan una baja estabilidad, por lo que la encapsulación por nucleación espontánea representa una alternativa para su protección. Por lo anterior se realizó la encapsulación del té verde Matcha usando sacarosa y lactosa en diferentes concentraciones y se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes. Ambos co-cristales presentaron una morfología amorfa, con color similar y adecuadas propiedades de flujo. Los co-cristales producidos por nucleación espontánea usando sacarosa al 60%, presentaron una mayor retención y mejores propiedades fisicoquímicas. La retención de compuestos polifenólicos y propiedades antioxidantes fue mayor cuando se utilizó lactosa como material de pared. Los co-cristales elaborados con sacarosa mostraron una mayor estabilidad durante el almacenamiento. Por lo tanto, se puede concluir que el tipo y porcentaje de disacárido tiene influencia sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de los co-cristales desarrollados.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los antioxidantes en diversos alimentos ha aumentado en los últimos años puesto que se ha demostrado que una dieta rica en dichos alimentos está asociada con un bajo riesgo de contraer enfermedades crónicas y cardiovasculares, atribuyendo este efecto protector a la presencia de compuestos bioactivos, dentro de los cuales destacan los fenoles [1]. Una fuente importante de antioxidantes son algunas hojas y brotes de plantas como la *Camellia sinensis*, de la cual se derivan diferentes tipos de té, como el té verde, té negro, té de matcha, entre otros. El té de matcha por su forma de obtención, cuenta con una gran cantidad de compuestos fenólicos, pero éstos están expuestos a su degradación debido a las condiciones ambientales. Por este motivo es importante emplear ciertos métodos de conservación de los compuestos bioactivos como lo es la encapsulación, que se puede definir como una técnica por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica conteniendo una sustancia activa [2]. Dentro de los procesos de encapsulación se encuentra la nucleación espontánea, que es un método fisicoquímico en el cual un disacárido encapsula un ingrediente activo para su conservación y protección, de esta manera su tiempo de degradación se prolonga [3]. Existe gran variedad de disacáridos, como ejemplo tenemos la lactosa y la sacarosa, que por su estructura química pueden ser un buen material de pared para realizar los co-cristales y su utilización está aún en desarrollo, por ello el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la sacarosa y lactosa en las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de co-cristales de té verde Matcha, para así conocer qué disacárido brinda mayor protección al ingrediente activo que contiene.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó la caracterización fisicoquímica y antioxidante del té verde matcha para conocer sus propiedades iniciales dentro de las cuales se le realizó humedad, actividad de agua, pH, fibra total, cenizas, porcentaje de acidez, porcentaje de inhibición del radical DPPH, IC₅₀, polifenoles totales y Vitamina C.

Se prosiguió a realizar la nucleación espontánea con sacarosa y lactosa por separado a concentraciones de 60 y 50% de disacárido en agua. Ésta se realizó a 130 °C con agitación constante del disacárido con el té hasta producir el co-cristal.

Para continuar se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los co-cristales a los cuales se les realizó humedad, actividad de agua, color en la escala LAB y XYZ, índice de oscurecimiento y cambio total de color con respecto al color del té.

Dentro de la evaluación de las propiedades antioxidantes se les realizaron porcentaje de inhibición del radical DPPH, IC₅₀ y Vitamina C.

RESULTADOS*Caracterización fisicoquímica del té verde matcha*

Con la metodología mencionada se realizó la evaluación fisicoquímica al té verde matcha obteniendo como resultados los presentados en la tabla 1. De acuerdo al contenido de humedad se tuvo un porcentaje de 0.94%, así como también una a_w de 0.484. Para los parámetros de color dentro de la escala de Lab se obtuvieron para el parámetro L fue de 60.24, el parámetro a fue -4.22 y el parámetro b 35.82 dando una coloración verde. De acuerdo al parámetro de cenizas se encontró un porcentaje de 7.02%, concluyendo así de acuerdo a esto que contiene una cantidad de minerales.

Tabla 12 Evaluación fisicoquímica del té

Propiedad	Resultado
Humedad (%)	0.94 ± 0.03
a_w	0.484 ± 0.003
pH	5.46 ± 0.02
Color	60.24 ± 0.49
L	
a	-4.22 ± 0.39
b	35.82 ± 1.24
Ángulo Matiz	276.71 ± 0.38
Cromaticidad	36.07 ± 1.28
X	26.26 ± 0.04
Y	28.72 ± 0.06
Z	12.16 ± 0.01
Índice de Oscurecimiento (%)	47.14 ± 0.09
Cenizas (%)	7.02 ± 0.15
Acidez total titulable (%)	0.43 ± 0.05
Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.	

Caracterización antioxidante del té verde matcha

Con respecto a la actividad antioxidante se realizaron pruebas de inhibición del radical DPPH a diferentes concentraciones de té verde matcha para así elegir cual sería la concentración de té para poder realizar las demás pruebas antioxidantes, dándonos porcentajes muy altos en concentraciones bajas, por lo cual se eligió la concentración de 0.001 mg/mL de té verde matcha, obteniendo un porcentaje de inhibición del radical DPPH de 77.10%. De acuerdo al resultado de polifenoles totales tenemos 3.22 mg EAG/g. En relación con el resultado de IC_{50} , el cual nos dice la concentración necesaria para inhibir el radical DPPH al 50%, siendo así que, a concentraciones más bajas mayor es la actividad antioxidante; para esta prueba se obtuvo un resultado de 0.007 mg/mL lo que indica una alta actividad antioxidante por parte del té verde matcha.

Tabla 13 Evaluación antioxidante del té

Propiedad	Resultado (0.001 mg/mL)
Polifenoles Totales (mg EAG/g)	3.22 ± 0.48
Inhibición DPPH (%)	77.10 ± 6.92
IC ₅₀ radical DPPH (mg/mL)	0.007 ± 0.73

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Evaluación fisicoquímica de los co-cristales

De acuerdo a la a_w se obtuvo para los co-cristales de sacarosa al 60% un valor de 0.656, para los co-cristales de lactosa al 60% un valor de 0.949, para los co-cristales de sacarosa al 50% un valor de 0.714 y para los co-cristales de lactosa al 50% un valor de 0.927, siendo los co-cristales de lactosa al 60% en los que obtuvo un mayor valor. Para los parámetros de color se obtuvo un índice de oscurecimiento en cuanto a los co-cristales de sacarosa al 60% de 26.32%, para los co-cristales de lactosa al 60% un valor de 37.33%, para los co-cristales de sacarosa al 50% un valor de 27.72% y para los co-cristales de lactosa al 50% un valor de 30.56%.

Tabla 14 Evaluación fisicoquímica de los co-cristales

Propiedad	Sacarosa 60%	Lactosa 60%	Sacarosa 50%	Lactosa 50%
a_w	0.656 ± 0.01	0.949 ± 0.02	0.714 ± 0.03	0.927 ± 0.01
Humedad (%)	1.60 ± 0.49	9.10 ± 1.06	1.15 ± 0.07	4.69 ± 0.26
Color				
L	76.85 ± 0.17	64.233 ± 0.16	74.02 ± 0.46	71.15 ± 0.07
a	-2.28 ± 0.17	-2.863 ± 0.21	-2.043 ± 0.13	-2.683 ± 0.06
b	21.63 ± 0.50	28.080 ± 0.12	22.113 ± 0.43	24.153 ± 0.55
Ángulo Matiz	276.02 ± 0.31	275.817 ± 0.20	275.276 ± 0.23	276.339 ± 0.04
Cromaticidad	21.75 ± 0.51	28.226 ± 0.14	22.208 ± 0.45	24.301 ± 0.55
Índice de Oscurecimiento (%)	26.32 ± 0.33	37.33 ± 0.62	27.72 ± 0.26	30.56 ± 0.50
X	47.88 ± 0.28	30.910 ± 0.33	43.84 ± 0.17	39.316 ± 0.04
Y	51.40 ± 0.35	33.397 ± 0.40	46.967 ± 0.18	42.383 ± 0.02
Z	35.50 ± 0.10	18.293 ± 0.10	35.50 ± 0.13	26.736 ± 0.32

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Evaluación de las propiedades de flujo de los co-cristales

Dentro de los parámetros de las propiedades de flujo se realizó la densidad aparente en la cual se obtuvo para los co-cristales de sacarosa al 60% una densidad de 0.60 g/mL, para los co-cristales de lactosa al 60% un valor de 0.57 g/mL, para los co-cristales de sacarosa al 50% un valor de 0.58 g/mL y para los co-cristales de lactosa al 50% un valor de 0.35 g/mL. Para densidad compactada se obtuvo para el co-cristal de sacarosa al 60% un valor de 0.97 g/mL, para el co-cristal de lactosa al 60% un valor de 0.73 g/mL, para los co-cristales de sacarosa al 50% un valor de 0.85 g/mL y para los co-cristales de lactosa al 50% es un valor de 0.47 g/mL. Los polvos que tienen valores de porosidad bajos tienen menor probabilidad de degradarse durante el almacenamiento. Para el porcentaje de porosidad se obtuvo para los co-cristales de sacarosa al 60% un porcentaje de 3.04%, para los co-cristales de lactosa al 60% un porcentaje de 38.27%, para los co-cristales de sacarosa al 50% un porcentaje de 2.25% y para los co-cristales de lactosa al 50% un porcentaje de 52.36%. La compresibilidad indica de qué manera la presión reduce el volumen de un conjunto de gránulos y sirve para determinar la fluidez de los polvos. Dentro del porcentaje de compresibilidad se obtuvo para los co-cristales de sacarosa al 60% un valor de 62.01%, para los co-cristales de lactosa al 60% un valor de 78.61%, para los co-cristales de sacarosa al 50% un valor de 68.89% y para los co-cristales de lactosa al 50% un valor de 74.96%. El ángulo de reposo es un método simple para caracterizar la fluidez, la magnitud de este ángulo está influenciada por la fricción y fuerzas entre las partículas, generalmente los polvos con ángulos de reposo menores o iguales a 40° tienen buena fluidez, mientras que ángulos de reposo mayores a 50° son indicadores de problemas de flujo. Para el ángulo de reposo de los co-cristales todos se encuentran por debajo de los 40°, esto indica buena fluidez. El índice de Haussner determina la cohesividad que presentan los polvos, un alto porcentaje de compresibilidad e índice de Haussner indican poca fluidez y alta cohesividad, entre más cohesivo sea un polvo, menor será la densidad aparente y mayor será la compresibilidad. Para los co-cristales de sacarosa al 60% se obtuvo un índice de Haussner de 1.61, para los co-cristales de lactosa al 60% un valor de 9.10, para los co-cristales de sacarosa al 50% se obtuvo un valor de 1.46 y para los co-cristales de lactosa 50% un valor de 4.69, de acuerdo a esto podemos decir que los co-cristales realizados con lactosa presentan mayor cohesividad que los realizados con sacarosa.

Tabla 15 Evaluación de las propiedades de flujo de los co-cristales

Propiedad	Sacarosa 60%	Lactosa 60%	Sacarosa 50%	Lactosa 50%
Densidad aparente (g/mL)	0.60 ± 0.04	0.57 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.35 ± 0.01
Densidad compactada (g/mL)	0.97 ± 0.05	0.73 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.47 ± 0.02
Porosidad (%)	3.04 ± 0.01	38.27 ± 0.28	2.25 ± 0.31	52.36 ± 2.86
Compresibilidad (%)	62.01 ± 0.83	78.61 ± 3.24	68.89 ± 7.13	74.96 ± 3.24
Densidad de partícula (g/mL)	0.87 ± 0.16	2.05 ± 1.47	0.89 ± 0.19	1.03 ± 0.06
Ángulo de reposo (°)	26.04 ± 1.20	30.22 ± 3.21	33.98 ± 2.18	29.19 ± 1.06
Índice de Haussner	1.61 ± 0.02	9.10 ± 0.05	1.46 ± 0.15	4.69 ± 0.05

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Evaluación antioxidante de los co-cristales

Dentro de la evaluación antioxidante se realizó el porcentaje de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) en el cual se tuvo para los co-cristales de sacarosa al 60% un porcentaje de 49.87%, para los co-cristales de lactosa al 60% un porcentaje de 55.82%, para los co-cristales con sacarosa al 50% un porcentaje de 64.93% y para los co-cristales de lactosa al 50% un porcentaje de

70.21%, siendo mayor para los co-cristales realizados con lactosa al 50%. Para la concentración de IC₅₀ tenemos que para los co-cristales con sacarosa al 60% se obtuvo 0.016 mg/mL, para los co-cristales de lactosa 60% se obtuvo una concentración de 0.011 mg/mL, para los co-cristales con sacarosa al 50% una concentración de 0.10 mg/mL y para los co-cristales de lactosa al 50% una concentración de 0.009 mg/mL siendo esta última la que presentó mejor actividad antioxidante.

Tabla 16 Evaluación antioxidante de los co-cristales

Propiedad	Sacarosa 60%	Lactosa 60%	Sacarosa 50%	Lactosa 50%
DPPH (%)	49.87 ± 1.21	55.82 ± 0.42	64.93 ± 0.91	70.21 ± 0.55
IC ₅₀ (mg/mL)	0.016 ± 0.58	0.011 ± 0.19	0.010 ± 0.37	0.009 ± 0.60
Vitamina C (mg/mL)	0.80 ± 1.24	0.77 ± 1.54	0.68 ± 1.18	0.59 ± 1.47

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

CONCLUSIONES

El té verde matcha posee altas propiedades antioxidantes que se reflejan en el contenido de polifenoles totales, porcentaje de inhibición del radical DPPH y la concentración de IC₅₀. Los co-cristales producidos por nucleación espontánea usando sacarosa y lactosa mantienen las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del té verde matcha.

De acuerdo al color los co-cristales realizados con lactosa al 60% conservan los parámetros más similares a los del té verde matcha. Los co-cristales realizados con lactosa al 50% presentan un mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH al igual que una menor concentración para el IC₅₀ haciendo así mayor su actividad antioxidante.

El tipo y porcentaje de disacárido tiene influencia sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de los co-cristales desarrollados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Peña, G., Salinas, Y. & Ríos, R. (2006). Contenido de Antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Estado de México.
2. Parra, R. (2011). Food Microencapsulation: A Review. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia.
3. Parzanese, M. (2012). Tecnologías para la industria alimentaria: Microencapsulación. Ministerio de Agroindustrias. Buenos Aires, Argentina.

DIÓXIDO DE SILICIO MEJORA EL COLOR Y LA CONCENTRACIÓN DE LICOPENO EN TOMATES SOMETIDOS A ESTRÉS SALINO

Víctor Hugo Carbajal-Vázquez, Libia Iris Trejo-Téllez, Fernando Carlos Gómez-Merino, Gabriel Alcántar-González, Prometeo Sánchez-García, Sara Monserrat Ramírez-Olvera, María de la Luz Buendía-Valverde

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, carbajal.victor@colpos.mx; tlibia@colpos.mx; fernandg@colpos.mx; alcantar@colpos.mx; promet@colpos.mx; ramirez.sara@colpos.mx; luzmaria_buendia@hotmail.com

RESUMEN

Se evaluaron diferentes concentraciones de dióxido de silicio y cloruro de sodio en el color y cuantificación de licopeno en frutos de tomate cv. Rio Supremo. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar en un arreglo factorial. El primer factor fue la concentración de cloruro de sodio (NaCl), evaluado a los niveles 0,50 y 100 mM. El segundo factor fueron aplicaciones foliares de dióxido de silicio (SiO₄) a tres concentraciones (0, 75 y 100 mg L⁻¹), resultando nueve tratamientos en el experimento. La luminosidad del fruto incrementó en 83.1 y 71.9% con el tratamiento con 50 y 100 mM NaCl, respectivamente, en comparación con el testigo. De la misma manera, el ángulo Hue tuvo un aumento medio de 74% con ambas concentraciones de NaCl. Por el contrario, el índice de saturación disminuyó en 35% en promedio. La aplicación foliar de Si no afectó el ángulo Hue ni el croma de frutos de tomate; por el contrario, redujo de manera significativa en su concentración de 150 mg L⁻¹ la luminosidad de fruto, dicha reducción fue de 7.5% respecto al testigo. La adición de NaCl a la solución nutritiva disminuyó significativamente la concentración de licopeno del fruto 47% en promedio con ambas dosis salinas, El efecto principal de la aspersión foliar de Si no fue significativo en la concentración de licopeno en frutos. Se concluye que la salinidad afecta positivamente parámetros de color y negativamente la concentración de licopeno, mientras que las dosis foliares de Si no presentaron efectos en las variables evaluadas.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático, es la variación del clima en todo el globo terráqueo en intervalos de tiempo determinado, es un fenómeno natural, que sin embargo se ha agravado por la acción del ser humano. Cambios extremos en parámetros meteorológicos como precipitación, radiación, temperatura afectan de manera directa la agricultura, ya que crece la incidencia de factores de estrés biótico y abiótico en los cultivos. En México, la salinidad es un factor que se ha acrecentado por el cambio climático, es resultado de bajas precipitaciones, además de altos índices de evaporación y radiación, y afecta mayormente a los estados del norte y los costeros. En 2015 la CONAGUA reportó 31 acuíferos con agua salobre en Baja California y el altiplano, y 15 en zonas costeras con intrusión marina.

Por otro lado, diversos estudios colocan al silicio (Si) como un elemento benéfico, principalmente en cereales y gramíneas, quienes se caracterizan por su capacidad de almacenar Si en las células. Snyder *et al.* (2007) encontró que altas dosis de Si en los cascos mejoran la calidad del grano en cereales como el arroz. La suplementación de Si en plantas de tomate bajo estrés por B mejoran el peso promedio del fruto (Kaya y Levent, 2011). En pepino se han encontrado pequeños pero significativos incrementos en pesos fresco y seco de raíz, menor marchitez de hojas y mayor concentración de clorofila, así como, incremento a la tolerancia por toxicidad por Mn (Alcántar y Trejo-Téllez, 2013); lo cual se puede traducir en mejor adquisición y uso de elementos que influyen en los frutos. De igual manera, Zbigniew (2013) encontró aumentos significativos en el rendimiento de frutos de pepino, mayor contenido de materia seca y sólidos solubles totales en plantas suplementadas con Si. Con base en lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto del silicio en parámetros de color y en la concentración de licopeno en frutos del segundo racimo de plantas de tomate sometidas a salinidad.

PARTE EXPERIMENTAL

El experimento se llevó a cabo en un invernadero tipo túnel con ventana cenital, de cobertura plástica y con malla antiáfidos en paredes laterales.

Se emplearon semillas de tomate híbrido F-1 Río Supremo de porte determinado. Para la obtención de plántulas, las semillas se sembraron en una charola de 200 cavidades previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 5%, con una dosis de 1 mL L⁻¹, como sustrato se utilizó turba

El sustrato utilizado para las macetas fue tezontle con tamaño medio de partícula de 5 a 6 mm. Para la obtención de este tamaño se cribó con una malla de 7 mm y posteriormente con una malla de 4 mm. Una vez obtenido el tamaño adecuado se llenaron las bolsas de 30 x 30 cm, calibre 400, especial para vivero. Para la desinfección del material se usó hipoclorito de sodio al 5%, a una dosis de 1 mL L⁻¹; cada maceta se inundó con 4 L de dicha solución aséptica, una vez drenada se dejó reposar durante 5 h. Posteriormente se hicieron tres enjuagues aplicando 4 L de agua por ocasión. El riego se realizó mediante un sistema por goteo en espagueti. Se colocaron 9 tanques de 200 L, cada contenedor contaba con una bomba de ½ HP, un ramaleo de PVC con regreso al tanque regulado con una válvula y una línea de salida con un filtro de anillos, ésta se conectaba a una manguera negra agrícola de 16 mm con tres goteros por contenedor, cada gotero contaba con una cruceta para cuatro tubines y cada tubín con una estaca, de esta manera, se tenían 12 bolsas irrigadas por línea.

Se estableció un experimento con el objetivo de evaluar el efecto del elemento benéfico Si aplicado vía foliar en plantas de tomate sometidas a estrés salino. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar en un arreglo factorial 3². El primer factor fue la concentración de cloruro de sodio (NaCl), evaluado a los niveles 0,50 y 100 mM en la solución nutritiva. El segundo factor fueron aplicaciones foliares del elemento benéfico en tres concentraciones (0, 75 y 100 mg L⁻¹), resultando nueve tratamientos. Cada tratamiento tuvo nueve repeticiones. La unidad experimental consistió en una planta sembrada en una bolsa a una distancia de 0.3 m de separación entre plantas y 0.8 m entre hileras. La adición de NaCl a la solución nutritiva se efectuó 30 días después del trasplante (DDT); mientras que las aspersiones foliares se comenzaron a los 31 DDT, de éstas se hicieron ocho aplicaciones a intervalos de 10 días. Cada aspersión se realizó a las 6:00 h hasta punto de goteo, en promedio cada planta se asperjó con 50 mL de solución por aplicación. Para ayudar a que la solución asperjada se adhiriera a la lámina foliar se le agregó surfactante Tween™ 20 con una concentración de 0.5 g L⁻¹. La fase experimental de la investigación se contabilizó a partir del trasplante, la duración fue de 108 días.

Los parámetros de color L (luminosidad), a (tonalidades de color verde con valores negativos o positivos para rojo) y b (valores negativos con tonalidades hacia el amarillo o positivo hacia el azul), se determinaron en dos puntos opuestos de la zona ecuatorial de cada fruto usando un colorímetro (Hunter Lab, modelo D25-PC2). Con los datos obtenidos en los parámetros antes mencionados, se calcularon el índice de saturación (croma) y el ángulo Hue como se describe a continuación:

$$\text{Croma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$\text{Hue} = \arctan (b/a)$$

Se estimó la concentración de licopeno empleando la ecuación siguiente propuesta por Arias y colaboradores (2000): Licopeno (mg 100 g⁻¹ peso fresco) = 11.848 x (a/b) + 1.5471

Donde "a" y "b" son los parámetros obtenidos con el colorímetro.

Con los resultados obtenidos se realizaron análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey. En las pruebas estadísticas aplicadas se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. En estos análisis se usó el software SAS (SAS, 2011).

RESULTADOS

La adición en tres niveles de NaCl (0, 50, y 100 mM) vía fertirriego presenta efectos diferenciales en los atributos de color luminosidad, tono (ángulo Hue), y el índice de saturación (Croma) del fruto de tomate (Figura 1a). La luminosidad del fruto incrementó en 83.1 y 71.9% con el tratamiento con 50 y 100 mM NaCl, respectivamente, en comparación con el testigo. De la misma manera, el ángulo Hue tuvo un aumento medio de 74% con ambas concentraciones de NaCl en comparación con el testigo. Por el contrario, el índice de saturación disminuyó en 35% en promedio, en comparación con el testigo, cuando la solución nutritiva contenía NaCl.

La aplicación foliar de Si no afectó el ángulo Hue ni el croma de frutos de tomate; por el contrario, redujo de manera significativa en su concentración de 150 mg L⁻¹ la luminosidad de fruto, dicha reducción fue de 7.5% respecto al testigo (Figura 1b).

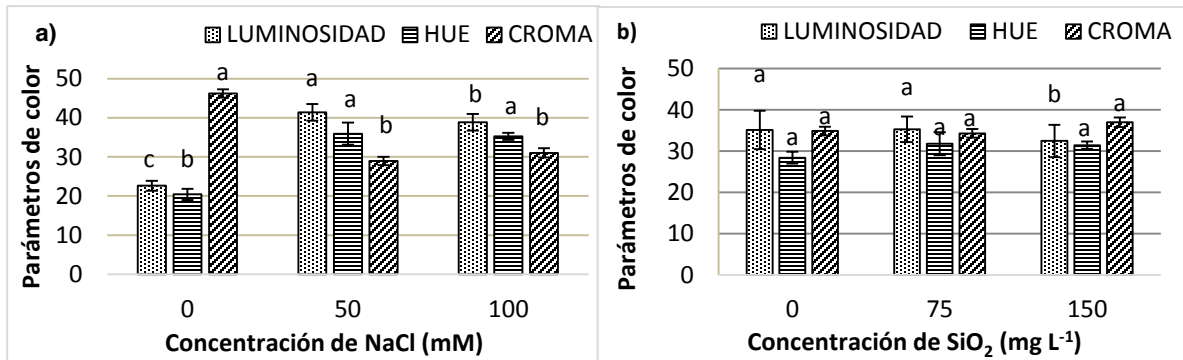


Figura 1. Efectos principales del NaCl (a) y SiO₂ (b) en parámetros del color de frutos de tomate. Medias ± DE con letras distintas en cada subfigura y variable, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P ≤ 0.05).

En la Figura 2 se presenta el efecto de la interacción de los factores de estudio en los atributos del color de frutos. De manera general se observa que solo con tratamiento con NaCl, la aplicación foliar de Si redujo la luminosidad del fruto; asimismo. Por otro lado, el ángulo Hue no fue influenciado por el Si, mientras que el NaCl lo incrementó, independientemente de su concentración. Por el contrario el croma fue significativamente menor en los tratamientos con NaCl y no fue influenciado por el Si entre niveles de salinidad.

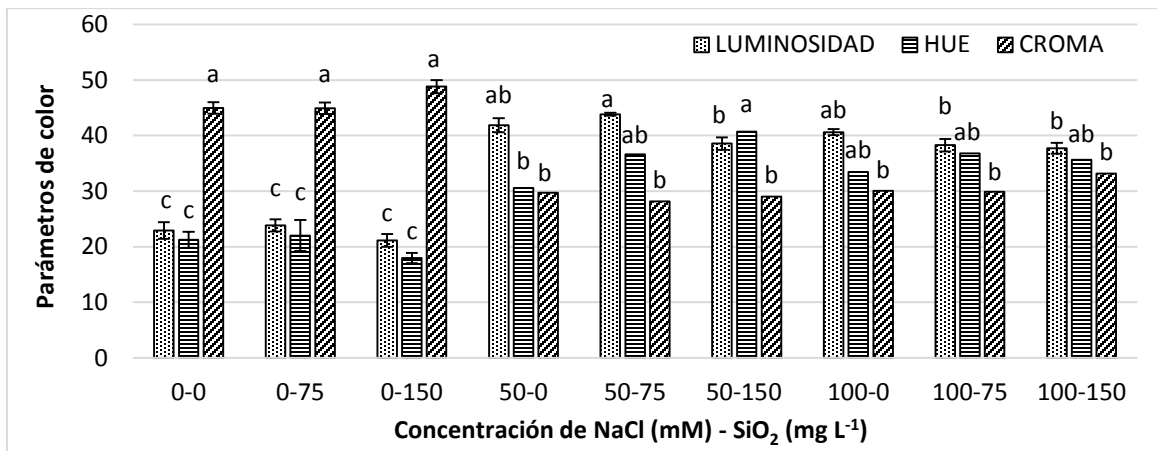


Figura 2. Efectos interactivos del NaCl y SiO₂ en los atributos de color de frutos de tomate. Medias ± DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P ≤ 0.05).

La adición de NaCl a la solución nutritiva disminuyó significativamente la concentración de licopeno del fruto (Figura 3a) en comparación con el testigo. Estos decrementos fueron en promedio de 47%. El efecto principal de la aspersión foliar de Si no fue significativo en la concentración de licopeno en frutos (Figura 3b).

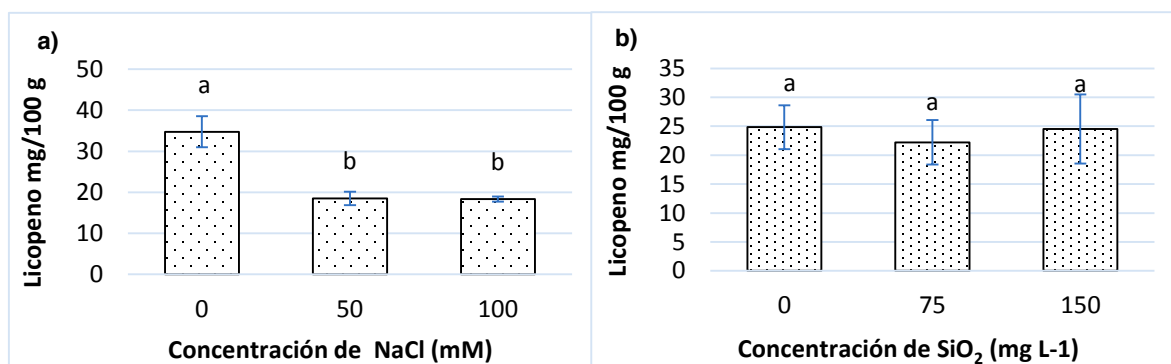


Figura 3. Efectos principales del NaCl (a) y SiO₂ (b) en la concentración de licopeno en frutos de tomate. Medias ± DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En la Figura 4 se presenta el efecto de la interacción de los factores de estudio en la concentración de licopeno en frutos, mismo que fue significativo solo entre niveles de NaCl en la solución nutritiva. Se observa que el aumento de 50 y 100 mM de NaCl en la solución nutritiva, disminuye significativamente el contenido de licopeno del fruto, ambos con respecto al testigo. Por otra parte, el Si no presentó efectos diferenciales significativos en el contenido de licopeno de fruto, entre niveles de salinidad.

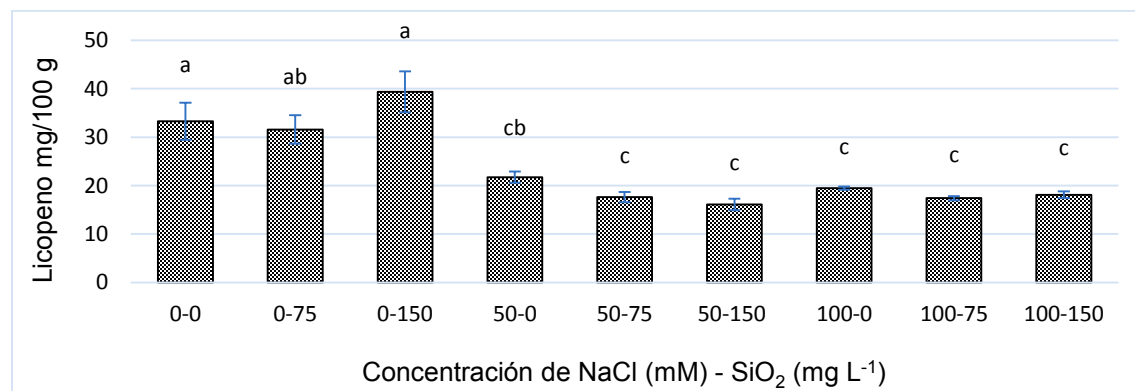


Figura 4. Efectos interactivos del NaCl y SiO₂ en la concentración de licopeno en frutos de tomate. Medias ± DE con letras distintas, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

NaCl incrementa significativamente luminosidad y ángulo Hue, contrariamente reduce el índice de saturación croma y la concentración de licopeno. El Si no presenta efectos en ángulo Hue y croma, así también en la concentración de licopeno; sin embargo afecta la luminosidad en forma negativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. Kaya, T. A. Levent, "Mitigation effects of silicon on tomato plants bearing fruit grown at high boron levels", *Journal of Plant Nutrition*, Vol. 34, 13, 2011, pp. 1985-1994.
2. CONAGUA, "Estadísticas del agua en México. Comisión Nacional del Agua y Secretaría del medio Ambiente y Recursos Naturales", 2015, 298 pp.
3. G. Alcántar-González, L. I. Trejo-Téllez, "Nutrición de Cultivos", Primera edición. Editorial Colegio de Postgraduados. México, 2013, 454 p.

-
4. H. G. Snyder, V. V. Matichenkov, E. L. Datnoff, "Silicon", *in*: Handbook of Plant Nutrition. Barker AV, Pilbeam DJ (eds.). Editorial Board. Is an imprint of CRC Taylor and Francis Group. New York, EUA, 2007, pp. 551-568.
 5. J. Zbigniew, "The effect of silicon application and type of substrate on yield and chemical composition of leaves and fruit of cucumber", *Journal of Elementology*, Vol. 18, 3, 2013, pp. 403-414.
 6. SAS Institute Inc., SAS/STAT Users Guide. Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA), 2011.

CONCENTRACIONES FOLIARES DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y POTASIO EN PLANTAS DE CHILE EXPUESTAS A CADMIO

María de la Luz Buendía Valverde, Tarsicio Corona-Torres, Libia Iris Trejo Téllez, Fernando Carlos Gómez-Merino, César Antonio Casasola-Elizondo, Sara Monserrat Ramírez-Olvera Víctor Hugo Carbajal-Vázquez y Víctor Héber Aguilar-Rincón

Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
e-mail: buendia.luz@colpos.mx

RESUMEN

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial y contaminante ambiental que es dispersado al ambiente por la combustión de vehículos, actividad minera, agronómica e industrial. Sus efectos en plantas son a nivel bioquímico, celular y fisiológico; dentro de éstos, los nutrimentos son de suma importancia. En este contexto, en esta investigación se estudiaron los efectos que el Cd tiene en la concentración foliar de nitrógeno, fósforo y potasio en plantas de tres variedades de Chile (Jalapeño, Poblano y Serrano) expuestas a 0, 5 y 10 μM Cd adicionadas a la solución nutritiva bajo condiciones de invernadero. La determinación de la concentración de N se realizó por el método Kjeldahl; la de P y K en extracto de digestión ácida leída en un equipo ICP-AES. Los tratamientos con Cd no afectaron la concentración foliar de N en las tres variedades de Chile evaluadas. La concentración de P en hojas de plantas tratadas con 5 μM Cd se redujo en 22% en la variedad Jalapeño; por el contrario, este tratamiento la incrementó en Serrano 20.4%. Por último la concentración foliar de K aumentó 15.8% en la variedad Poblano en plantas tratadas con 5 μM Cd con respecto al testigo. Los resultados obtenidos muestran efectos diferenciales en la concentración de N, P y K en Chile.

INTRODUCCIÓN

El Cd es un elemento que fue descubierto en 1817 por el alemán Friedrich Stromeyer, forma parte del grupo 12 de la tabla periódica, posee una masa atómica de 112.41, número atómico 48, densidad relativa de 8.64 g cm^{-3} , punto de ebullición de 765 °C, punto de fusión de 320.9 °C, radio atómico de 1.54 Å (WHO, 1992a; Raskin *et al.*, 1994). Aunque de forma natural se encuentra a bajas concentraciones es considerado tóxico, por ello se encuentra dentro de la lista de contaminantes ambientales (U. S. EPA, 1999).

Al combinarse con otros elementos, el Cd forma cloruros, óxidos, sulfuros, entre otros, los cuales son utilizados en distintos procesos industriales: chapado protector de acero, estabilizadores para PVC, pigmentos de plástico y vidrio, material de electrodo en baterías de níquel-cadmio y como componente en aleaciones (WHO, 1992b).

Es dispersado al ambiente principalmente por actividades industriales como la minería, fundición de metales, quema de combustibles fósiles y el uso de fertilizantes. Estas prácticas antropogénicas provocan que gran parte de los desechos de Cd sean removidos y precipitados, donde se unirán fuertemente a las partículas del suelo permaneciendo en él por muchos años, ya que se estima que el tiempo de vida media del Cd es de 15 a 30 años (Martin y Kaplan, 1998; Pernía *et al.*, 2008).

El Cd en el suelo puede tener serias repercusiones al ser incorporado al suelo, ya que es la principal fuente de compuestos y elementos para las plantas (Oancea *et al.*, 2005). Y aunque las plantas pueden tener distintas capacidades para almacenar metales, acumuladoras, indicadoras y excluyentes (Seregin e Ivanov, 2001), la resistencia que puede tener la planta hacia el Cd puede variar dependiendo del mecanismo que presente la planta, la variedad y hasta la especie (Das *et al.*, 1997; Benavides *et al.*, 2005).

Los diversos estudios que se han realizado con el Cd han mostrado que la principal ruta de absorción es a través de la raíz, y que la absorción va a depender de la biodisponibilidad y concentración de Cd en el suelo, sin embargo, también van a intervenir otras propiedades fisicoquímicas, tal es el caso de materia orgánica, el pH, el potencial redox y la temperatura (Pernía *et al.*, 2008).

Los efectos que puede provocar el Cd en las plantas se han documentado en diversos estudios, frecuente los autores concuerdan que entre más altas sean las concentraciones y el tiempo de exposición más severas serán las alteraciones en el metabolismo y crecimiento de la planta (Oancea *et al.*, 2005), de manera general el Cd provoca inestabilidad en la entrada, transporte y uso de elementos esenciales como el Ca, Mg, P y K, lo que puede llevar a la planta a un desequilibrio

nutrimental, lo que puede resultar en alteraciones de la apertura estomática, desbalance hídrico, así como alteraciones en el ciclo de Calvin, la fotosíntesis, la transpiración, el metabolismo de los carbohidratos (Benavides *et al.*, 2005).

En contexto a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto que tiene el cadmio, en las concentraciones foliares de N, P y K en tres variedades de chile: Jalapeño, Poblano y Serrano.

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se realizó en un invernadero de estructura metálica y cubierta de polietileno ubicado en el Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, en Texcoco, Estado de México, a una altitud de 2250 m.

Se utilizaron semillas de tres variedades híbridas de chile Jalapeño, Poblano y Serrano, de las cuales se obtuvieron plántulas sanas de 15 a 20 cm de altura, fueron trasplantadas en bolsas negras de plástico de 7 L de capacidad con tezontle como sustrato, distribuidas completamente al azar con seis repeticiones cada una. Se montó un sistema de riego por goteo, donde se suministró solución nutritiva Steiner (Steiner, 1984), a la cual se le añadió 0, 5 y 10 μM Cd.

Después de 80 días de tratamiento, se realizó el corte de las plantas, el material vegetal se secó en una estufa de aire forzado, después del secado las muestras se molieron y fueron llevadas al laboratorio para realizar el análisis químico de N, P y K, el cual consistió en determinar la concentración de N por el método Semi-micro Kjeldhal, el cual consiste en hacer una digestión con la muestra y la mezcla de ácido sulfúrico-salicílico, el extracto se destiló y título con H_2SO_4 0.05N. Para determinar la concentración de P y K, se determinó en el extracto producto de la digestión de material vegetal seco y molido con ácido perclórico y ácido nítrico, siguiendo la metodología descrita por Alcántar y Sandoval (1999), usando equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-Varian 725-ES).

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias con la prueba LSD ($P \leq 0.05$), para cada metal y variedad evaluados, usando el software SAS (SAS, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones foliares de N en chile Serrano "Tampiqueño, después de 80 d del trasplante, reportadas por Cruz-Crespo *et al.* (2014) oscilaron entre 37.8 y 45.7 g kg^{-1} de materia seca. En este intervalo se encuentran las concentraciones para chile Serrano registradas en este estudio, independiente del tratamiento con Cd como se observa en el **Cuadro 1**. Por otro lado, el intervalo de suficiencia para N en hojas en etapa de fructificación reportado por Mills y Jones (1996), oscila de 35 a 50 g kg^{-1} de materia seca. Asimismo, dentro de este intervalo se ubican las concentraciones foliares de N en las tres variedades evaluadas tratadas con las diferentes concentraciones de Cd.

Cuadro 1. Concentración foliar de N (g kg^{-1} de materia seca), en plantas de tres variedades de chile tratada durante el ciclo de producción con cadmio en la solución nutritiva bajo condiciones de invernadero.

Cd, μM	Variedades		
	Jalapeño	Poblano	Serrano
0	39.49 \pm 1.09 a	38.97 \pm 1.26 a	41.94 \pm 1.16 a
5	41.24 \pm 1.44 a	37.86 \pm 1.09 a	41.94 \pm 1.38 a
10	39.67 \pm 1.45 a	38.15 \pm 1.47 a	39.49 \pm 1.29 a
DMS	3.30	3.15	3.15

Medias \pm DE en cada columna con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

El rango de suficiencia para P en hojas de chile de plantas en fructificación va de 2.2 a 7 g kg^{-1} de materia seca (Mills y Jones, 1996); en este intervalo se encuentran los resultados obtenidos en este estudio (Cuadro 2).

El Cd no tuvo efecto en la concentración de P en hojas de plantas de chile Poblano. Por otra parte, en la variedad Jalapeño, la dosis baja de este de Cd adicionada a la solución nutritiva (5 μM Cd) reduce en un 22.4% la concentración foliar de P; mientras que para la variedad de chile Serrano en

la dosis baja de (5 μM Cd) el P se incrementó en 20.4%; en ambos casos respecto al testigo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración foliar de P (g kg^{-1} de materia seca), en plantas de tres variedades de chile tratada durante el ciclo de producción con cadmio en la solución nutritiva bajo condiciones de invernadero.

Cd, μM	Variedades		
	Jalapeño	Poblano	Serrano
0	2.63 \pm 0.23 a	2.54 \pm 0.16 a	1.62 \pm 0.14 b
5	2.04 \pm 0.08 b	2.60 \pm 0.14 a	1.95 \pm 0.08 a
10	2.32 \pm 0.07 a,b	2.56 \pm 0.22 a	1.72 \pm 0.07 ab
DMS	0.35	0.43	0.24

Medias \pm DE en cada columna con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

El rango de concentración de suficiencia para K en hojas de plantas de chile en etapa reproductiva oscila de 35 a 45 g kg^{-1} de materia seca (Mill y Jones, 1996). Las concentraciones de K en hojas de plantas de la variedad Jalapeño aquí obtenidas son superiores a este intervalo, independiente del tratamiento recibido. Los resultados en Poblano y Serrano, de manera general, se encuentran dentro del rango de suficiencia (Cuadro 3).

Se observa que el Cd solo tuvo efectos significativos en la concentración de K en hojas de plantas de la variedad Poblano, con un incremento significativo de 15.8% con la concentración 5 μM , respecto al testigo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentración foliar de K (g kg^{-1} de materia seca), en plantas de tres variedades de chile tratada durante el ciclo de producción con cadmio en la solución nutritiva bajo condiciones de invernadero.

Cd, μM	Variedades		
	Jalapeño	Poblano	Serrano
0	52.84 \pm 2.29 a	39.42 \pm 2.18 b	45.02 \pm 1.63 a
5	49.28 \pm 2.80 a	45.66 \pm 2.80 a	46.34 \pm 2.55 a
10	50.79 \pm 1.44 a	40.20 \pm 2.52 ab	40.09 \pm 4.35 a
DMS	5.53	6.18	7.52

Medias \pm DE en cada columna con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

El Cd incrementó de manera significativa la concentración foliar de K en la dosis baja evaluada (5 μM) en la variedad Poblano; mientras que redujo las concentraciones foliares de P en las variedades Jalapeño y Serrano.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. A. Steiner, "The universal nutrient solution. 6th international congress on soilless culture", Wageningen, Holanda, 1984, pp. 633-650 95
2. B. Pernía, A. De Sousa, R. Reyes, R. Castrillo, "Biomarcadores de contaminación por cadmio en plantas", Interciencia, Vol. 32, 2, 2008, pp. 112-119.
3. E. Cruz-Crespo, A. Can-Chulim, R. Bugarín-Montoya, J. Pineda-Pineda, R. Flores-Canales, P. Juárez-López, G. Alejo-Santiago, "Concentración nutrimental foliar y crecimiento de chile serrano en función de la solución nutritiva y el sustrato", Revista Fitotecnia Mexicana, Vol. 37, 3, 2014, pp. 289-295.
4. G. Alcántar, M. Sandoval, "Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal", Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C. Publicación especial No. 10, 1999, Chapingo, México.

5. H. A. Mills, J. B. Jr. Jones, "Plant Analysis Handbook II", MicroMacro Publishing, Inc. Athens, Georgia, USA. 1996
6. H. W. Martin, D. I. Kaplan, "Temporal changes in cadmium, thallium, and vanadium mobility in soil and phytoavailability under field conditions", *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 101, 1, 1998, pp.399-410.
7. I. Raskin, P. N. Kumar, S. Dushenkov, D. E. Salt, "Bioconcentration of heavy metals by plants", *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 5, 3, 1994, pp. 285-290.
8. I. V. Seregin, V. B. Ivanov, "Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants", *Russian Journal of Plant Physiology*, Vol. 48, 4, 2001, pp. 606-630.
9. M. P. Benavides, M. Gallego, M. L. Tomaro, "Cadmium toxicity in plants", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Vol. 17, 1, 2005, pp. 21-34.
10. P. Das, S. Samantaray, G.R. Rout, "Studies on cadmium toxicity in plants: a review", *Environmental Pollution*, Vol. 98, 1, 1997, pp. 29-36.
11. S. Oancea, N. Foca, A. Airinei, "Effects of heavy metals on plant growth and photosynthetic activity", *Analele Univ. "Al. I. Cuza*, Vol. 1, 2005, pp.107-110.
12. SAS Institute Inc. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., 2011, Cary, N. C., USA.
13. U. S. EPA, Environmental Protection Agency. Toxicological review of cadmium and compounds. Washington, D. C. 1999, 85 p.
14. WHO, Environmental Health Criteria 134. Cadmium. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. 1992a, Ginebra, Suiza.
15. WHO, Environmental Health Criteria 135. Cadmium-Environmental Aspects. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety, WHO. 1992b, Ginebra, Suiza.

BIOCONTROL DE TIZÓN DE HALO EN PLANTA DE FRIJOL BAJO LA APLICACIÓN DE EXTRACTO DE ORÉGANO

Sonia Valdez-Ortega, Deisy Nayely Rodríguez Sierra, Ixchel Abby Ortiz-Sánchez, Erika Cecilia Gamero-Posada, Mirka Maily Acevedo-Romero.

Instituto Tecnológico Del Valle Del Guadiana, E-mail: cecygampo@hotmail.com

RESUMEN

El presente trabajo propone una alternativa de uso de productos orgánicos como los extractos vegetales, que contienen sustancias activas que inhiben el desarrollo de enfermedades en ciertos cultivos de interés comercial. El objetivo fue evaluar la efectividad de la aplicación de extractos de orégano sobre el crecimiento de Tizón de Halo en plántulas de frijol en invernadero. Se llevó a cabo la infección de las semillas con la bacteria y se sembraron en charolas; posteriormente se trasplantaron en macetas a las cuales se les aplicaron los tratamientos. Se realizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 5*6 donde el Factor A fueron las dosis de extracto de orégano (4, 6 y 8 mL), un testigo negativo (100 mL de agua) y un testigo positivo (hipoclorito de sodio al 5%), el Factor B fueron los días después de la siembra (7, 14, 21, 28, 35 y 42 DDS). Las variables dependientes fueron: altura de planta y presencia de bacteria. El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los factores y la interacción. La prueba de diferencia de medias de LSD de Fisher ($\alpha=0.05$) indicó que la dosis del extracto de orégano es igual de efectiva que el hipoclorito de sodio, así mismo no se presentó sintomatología de la bacteria. Por lo tanto, la aplicación de extractos vegetales es una alternativa orgánica de control fitosanitario de las enfermedades de Tizón de Halo en cultivos de frijol.

INTRODUCCIÓN

El frijol, es el cultivo de mayor importancia económica, alimenticia y social en Durango. En México el cultivo del frijol, con frecuencia es atacado por enfermedades bacterianas como son el Tizón Común y de Halo, los cuales tienen una amplia distribución en las zonas productoras de esta leguminosa (Campos, 1991; Navarrete, 1996). El Tizón de Halo, inducido por *Pseudomonas syringae*, provoca la defoliación prematura de las plantas y puede llegar a causar la muerte de plantas jóvenes de genotipos susceptibles (Campos, 1991; Navarrete y Acosta, 2000).

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisorias, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente, (Aida T. Rodríguez, Morales y Ramírez, 2000). Así como su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad de producción, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables. Estos productos han sido estudiados por muchos años y diferentes especies de orégano han demostrado actividad biológica tales como: antifúngica, antibacteriana, insecticida, nematocida y antioxidante, (Cueto Wong; 2010). Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de la aplicación de extractos de orégano sobre el crecimiento de Tizón de Halo en plántulas de frijol en invernadero.

TEORIA

En México existe una gran cantidad de enfermedades bacteriológicas que atacan a los cultivos causando grandes pérdidas en la producción y calidad del producto, tal es el caso de la bacteria *Pseudomonas syringae* (Tizón de halo), afectando principalmente al cultivo del frijol. Ésta enfermedad bacteriana se ubica dentro de los primeros cuatro problemas fitosanitarios que afectan al cultivo (López, 1991). Los estados donde se presenta con más frecuencia son: Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Estado de México, Tlaxcala, Puebla y Durango (Campos, 1987; Navarrete y Acosta, 2000). En este último, el cultivo de frijol es de gran importancia económica alimenticia y social en el estado, ya que ocupa el segundo lugar a nivel nacional por la producción que registra (Rosales et al., 2009; Rosales et al., 2016). Este tipo de enfermedad se encuentra presente en un 83 % de las áreas de producción de semilla y hasta un 79 % en campos comerciales del cultivo, siendo la temperatura superior a 27 °C y una alta humedad relativa los factores que optimizan su desarrollo e infestación (Fourie, 2002). De no efectuar un control eficiente durante el ciclo agrícola, es capaz de causar severos daños que se ven reflejados

en la disminución de la calidad del grano y rendimiento del frijol hasta un 47 %, lo cual reduce el precio de venta y los beneficios económicos obtenidos por los productores (López, 1991). Entre las soluciones propuestas para el control de esta enfermedad, se encuentra la aplicación de pesticidas químicos, sin embargo, han tenido efectos negativos sobre el ambiente, incluso sobre aspectos relacionados con la calidad de vida de las poblaciones humanas. Asimismo, se ha demostrado que su eficacia puede ser de corta duración y que algunas plagas y patógenos pueden presentar resistencia a los ingredientes activos de los productos (López et al., 2005). Otra opción es el empleo de productos orgánicos que contienen toxinas o sustancias que inhiben el desarrollo de las enfermedades. El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisoriosa, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente (Rodríguez et al., 2000).

Algunos extractos vegetales poseen actividad antimicrobiana y fungicida que no perjudican al cultivo, sino por el contrario favorecen la producción o el rendimiento de las cosechas; entre ellos se encuentran los extractos y aceites esenciales de orégano (García et al., 2006). Estos bioproductos se caracterizan por la presencia de determinados compuestos de origen natural, los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas (Villalobos, 1996) y son agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides (Harborne, 1993).

PARTE EXPERIMENTAL.

Áreas de trabajo.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Agroquímica del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana ubicado en Carretera Durango-México Km. 22.5 Ejido Villa Montemorelos. Así como en el campo experimental del Valle del Guadiana INIFAP, ubicado en carretera al Mezquital-Durango Km 4, Camino Real, 34170 Durango, Dgo. La bacteria evaluada fue *Pseudomonas syringae*, la cual se aisló de semilla de frijol var. Pinto Saltillo.

Trabajo de laboratorio.

Aislamiento de cepas nativas

La cepa utilizada en este trabajo fue aislada de semillas de frijol Pinto Saltillo que fue producida en el municipio Panuco de Coronado, Durango en 2017, que presentaba signos claros de tizón de halo. Muestras de 10 g de semilla fueron selladas en la región hilar utilizando pegamento a base de cianoacrilato. Las semillas se desinfectaron usando una solución de hipoclorito de sodio al 2%, en agitación constante durante 3 min y luego enjuagadas con agua destilada estéril. En condiciones asépticas, las semillas secas fueron molidas en 90 mL de buffer de fosfatos en una licuadora doméstica durante 1 min, para liberar al patógeno de los tejidos de la semilla. La bacteria se aisló por medio de diluciones seriadas decimales, que luego fueron sembradas sobre B-King por la técnica de extensión en superficie. La incubación se llevó a cabo a 30°C por 48 h. Los aislados fueron confirmados considerando la morfología colonial, morfología microscópica, metabolismo y una curva de crecimiento por espectrofotometría a 660nm.

Posteriormente, la bacteria se creció sobre agar nutritivo por la técnica de agotamiento y se cosechó raspando el medio con una varilla de vidrio en "L" y buffer de fosfatos, la suspensión bacteriana se colocó dentro de un tubo estéril con tapa.

Para la obtención del extracto de orégano se utilizó la técnica de arrastre por vapor, la cual consistió en colocar 200 gr de material seco en una olla de presión con 3 L de agua, se tapó con un tapón de hule para evitar pérdida de vapor. Se conectó la olla de presión a un condensador con un tapón de hule horadado cerciorándose que no hubiera fugas de vapor, y con la corriente de agua de abajo hacia arriba. Con un mechero, se calentó la mezcla hasta ebullición con el fin de generar vapor, recuperando de esta manera el extracto. Se suspendió el calentamiento alrededor de 3 a 4 horas. Enseguida se colocó el extracto en un matraz de separación, obteniendo así el aceite esencial y el extracto acuoso. El extracto obtenido se colocó en un frasco ámbar y se almaceno en refrigeración hasta su uso. El material vegetal utilizado durante el experimento fue obtenido comercialmente en la ciudad de Durango, Dgo.

Área experimental y distribución de tratamientos

Para evaluar el extracto se realizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 5*6 donde el Factor A fueron dosis de extracto de orégano (4, 6 y 8 mL), un testigo negativo

(100 mL de agua) y un testigo positivo (hipoclorito de sodio al 5%). Las variables dependientes fueron: altura de planta (cm) y presencia y/o ausencia de bacteria.

Trabajo de campo.

Para la infección de la semilla de frijol se sembró en 6 cajas Petri la bacteria de tizón de halo (*Pseudomonas syringae*) en agar nutritivo, cosechándola con 5 ml de búfer de fosfato en cada caja Petri. Posteriormente, para la infección se colocaron 30 semillas en un vaso de precipitados agregando toda la solución que se cosecho y agitando por 5 min, enseguida se puso a secar un poco la semilla. A las semillas infectadas, se les aplicaron los tratamientos de extracto, y testigo positivo (hipoclorito de sodio al 5%) las cuales se agitaron por 30 min antes de su siembra.

El Factor B fueron los días después de la siembra (7, 14, 21, 28, 35 y 42 DDS). Colocando en cada una de estos días el extracto en diferentes porcentajes dependido de la dosis, se aplicaron dos diferentes cantidades a lo largo de todo el experimento dependiendo de la etapa fisiológica del cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Cantidades de dosis de extracto y agua.

	Cantidad de extracto	Cantidad de agua	Porcentaje (%)
Dosis día 7, 14	8 ml	0 ml	100 %
	6 ml	2 ml	75 %
	4 ml	4 ml	50 %
Dosis día 21, 28, 35 y 42	50 ml	0ml	100 %
	37 ml	13 ml	75 %
	25 ml	25 ml	50 %

Previo a la siembra se desinfectaron las charolas con una solución de hipoclorito de sodio al 5%

RESULTADOS

En el proceso de arrastre de vapor del orégano se obtuvo, 1.760 L de extracto acuoso, base a los datos analizados de la variable dependiente (la altura) para la bacteria *P. syringae* se obtuvieron los siguientes resultados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Crecimiento de la bacteria *P. syringae* bajo la aplicación de extractos de orégano.

FACTORES	NIVEL	ALTURA	
DOSIS A	4	29.34	A
	6	24.58	A B
	8	17.96	C
	TCL	22.33	B C
	T	11.78	D
DIAS B	42	55.27	A
	35	38.93	B
	28	12.23	C
	14	8.42	C D
	21	8.40	C D
	7	3.93	D
INTERACCION A*B		ns	
R²		0.93	
C.V		37.44	

†Medias con diferente letra en la misma columna y factor indican diferencia significativa, según la prueba de LSD ($P \leq 0.05$). ns = no significativo, * = significativo $\alpha = 0.05$, ** = altamente significativo $\alpha = 0.01$, C.V= coeficiente de variación.

El análisis de varianza de los datos obtenidos de la evaluación del efecto de extractos de orégano sobre la viabilidad de *P. syringae* (Tizón de Halo), muestra que existe diferencia significativa entre los extractos ($p < 0.05$), en la comparación de medias de LSD ($\alpha = 0.05$) con respecto al factor A, el análisis muestra que hubo un mejor control de crecimiento de la bacteria en una menor concentración de extracto de orégano (100 %) en comparación del más grande. Con respecto al factor B, muestra que existe diferencia significativa entre los días, pudiendo controlar con más eficacia en la fase reproductiva como es la formación de la vaina, después de 42 días de la aplicación del extracto, entre los demás días no mostró diferencia significativa. Esto atribuye a que los extractos de plantas han demostrado su efectividad antimicrobiana contra agentes fitopatógenos (Cueto Wong, 2010).

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se demuestra que los extractos son una buena alternativa para el control de bacterias gracias a la relación con los compuestos fenólicos, carvacrol y timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas (Aballa y Rosen, 2001), como es en el caso de la enfermedad del Tizón de Halo, como se mencionó anteriormente, logra controlar la bacteria en una concentración del 25 %, entre menor sea la cantidad de extracto mayor resultado, seguido por la de 50 % y por último la de 100 %.

BIBLIOGRAFIA

1. Aballa, A. and Rosen, J. P. 2001. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings, *European Food Research and Technology*. 212: 551-560.
2. Acosta-Gallegos, J. A. y Navarrete M., R. 1996. Identificación de genotipos de frijol con resistencia múltiple a enfermedades en la Mesa Central de México. *Agric. Téc. Méx.* 22(2):187-197
3. Campos, A. J. 1991. Enfermedades de frijol. Editorial Trillas. Primera edición. México. p. 70 - 73.

4. Cueto-Wong C. Marzo, 2010. Comunidad de Instituciones de Educación Superior de la Laguna. Ponente. Productos Naturales para el Control de Agentes Fitopatógenos. Segundo Encuentro Regional de Investigadores.
5. Fourie, D. 2002. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. *Phytopathology*. 150 (4-5):220-226.
6. García C. E. A., Quezada V. M. Y. Moreno L. J., Sánchez H. G., Moreno M. E., Pérez R. M. C. J., 2006. "Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* blume) y orégano (*Origanum vulgare* l.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera" *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1) pp 8-12.
7. Harborne, J. B. 1993. *Phytochemical Dictionary. Handbook of bioactive compound from plants*. Taylor and Francis, p. 791.
8. López B. A., López B. S. R., Vázquez B. M. E., Rodríguez H. S. A., Mendoza E. M., Padrón E. 2005. "Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos" *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23 (2) pp 183-190.
9. López, F. L. C. 1991. Definición de prioridades de investigación fitopatológica para la zona templada del Altiplano Central de México. *Agricultura Técnica Mexicana* 17:17-54.
10. Navarrete, M. R. y Acosta-Gallegos, J. A. 2000. Resistencia del frijol al tizón de halo en el Valle de México y progreso de la enfermedad. *Rev. Fitotec. Mex.* 23:17-28.
11. Prudencio Sains, José Manuel; Navarrete Maya, Rosa; Navarrete Maya, Jorge; Acosta Gallegos, Jorge Alberto Dinámica. abril-junio, 2008 pp. de los tizones común y de halo del frijol en el Valle de México *Agricultura Técnica en México*, vol. 34, núm. 2, 213-223 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Texcoco, México.
12. Rodríguez, Aida T.; Morales, Daysi; Ramírez, M. A. abril-junio, 2000 pp. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos *Cultivos Tropicales*, vol. 21, núm. 2. 79-82 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba.
13. Rosales S., R.; J. A. Acosta G.; F. J. Ibarra P.; E. I. Cuéllar R.; C. A. Nava B. 2009. Validación de variedades y líneas mejoradas de frijol en Durango. *Publicación Especial Núm 27. INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Valle del Guadiana. Durango, Méx.* 93 p

ESTUDIO COMPARATIVO DE ABSORCIÓN DE CALCIO A PARTIR DE TORTILLAS DE MAIZ ELABORADAS POR UN MÉTODO ECOLÓGICO DE NIXTAMALIZACIÓN

Héctor Eduardo Martínez Flores¹, Diana Cecilia Maya Cortés¹, Juan de Dios Figueroa Cárdenas² y Ma. Guadalupe Garnica Romo³

¹Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México, E-mail: hedu65@hotmail.com, ²CINVESTAV-IPN. Unidad Querétaro, Querétaro, Qro., México, ³Facultad de Ingeniería Civil, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México

RESUMEN

La nixtamalización para producir tortillas se basa en el cocimiento de los granos de maíz con cal. Actualmente se buscan alternativas al proceso tradicional de nixtamalización. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del tipo de nixtamalización de tortillas de maíz, tradicional y ecológico, en la absorción de calcio evaluado en ratas Wistar. Para ello, el grano de maíz fue cocido con agua e hidróxido de calcio [1 % p/p] para el método tradicional y sulfato de calcio (1.8% p/p) para el ecológico; ambos fueron cocidos a 90 °C por 40 min; los granos cocidos y reposados, se escurrieron, lavaron y se molieron hasta obtener masa, de la cual se obtuvieron las tortillas de ambos procesos; para conocer la biodisponibilidad del calcio en dietas elaboradas a partir de las tortillas tanto del método ecológico (DE) como del tradicional (DT), se realizó un ensayo biológico con ratas Wistar. A los fémures de las ratas se les realizó una caracterización química, biomecánica y morfológica. No se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la fuerza máxima de compresión sobre el fémur, siendo de 1149 g/mm para los fémures de las ratas alimentadas con la DE y 1087 g/mm para los de la DT. Ambas fueron diferentes comparadas con los fémures de las ratas alimentadas con una dieta de tortilla comercial (910 g/mm) y con la dieta a base de maíz sin nixtamalizar 577. El fémur de las ratas alimentadas con la dieta de maíz presentó osteopenia intracortical. Para DT y DE no se observó osteopenia. El método ecológico es una alternativa viable para producción de tortillas ya que muestra propiedades de absorción de calcio [similares al método tradicional, con la ventaja que no genera efluentes altamente contaminantes.

INTRODUCCIÓN

La tortilla elaborada por el proceso de nixtamalización ha sido consumida desde épocas remotas en México, siendo parte de la cultura de muchos de los pueblos originarios de América (1) y trascendiendo su consumo a la actualidad. Este producto forma parte de la dieta de todos los estratos sociales en México, con un consumo *per cápita* de 325 g/día. En zonas rurales las tortillas proveen alrededor del 70% del total de las calorías y 50% de las proteínas ingeridas por día (2).

El proceso de nixtamalización hace que la tortilla tenga mayor calidad nutricional comparada con el maíz crudo. El componente esencial de la nixtamalización es la cocción del maíz en hidróxido de calcio (cal), seguido por una etapa de reposo, y un posterior lavado para la eliminación del pericarpio; en seguida, una molienda para obtener masa, la cual puede ser cocida hasta obtener tortillas, o bien deshidratarse y molerse para obtener harina instantánea. La cocción en cal tiene varias ventajas: facilita la remoción del pericarpio, controla la actividad microbiana y, mejora la absorción de agua y el valor nutricional. A pesar de todos los beneficios de calidad mencionados, el proceso de nixtamalización presenta limitantes tecnológicas y ecológicas. Un problema que le representa a la industria para preparar harinas instantáneas y masa de nixtamal es el gran volumen de nejayote (palabra de origen náhuatl que significa caldo de cal) o agua de desecho generada, el cual es muy contaminante y con alto contenido de sólidos solubles y cal. Como resultado de este proceso ocurren pérdidas importantes de tiamina, niacina, riboflavina, grasa, pericarpio (fibra) y almidón presentes en el nejayote (3,4).

Los procesos ecológicos desarrollados en la actualidad, son nuevas alternativas creadas para minimizar el volumen de efluentes contaminantes, reducir tiempo de procesamiento y evitar pérdidas de nutrientes, tal como ocurre en el proceso tradicional de nixtamalización. En el CINVESTAV-IPN Unidad Querétaro se desarrolló un proceso (5) sustituyendo Ca(OH)_2 por CaSO_4 , de esta manera se cumplen los fines antes expuestos. Con la aplicación de esta nueva tecnología ecológica de nixtamalización, se podrán obtener tortillas integrales, ya que se aprovecharía todo el pericarpio y

la capa aleurona del grano de maíz. La tortilla integral posee los nutrientes de las capas externas del maíz que en el proceso tradicional se pierden y es allí, donde se concentran proteínas, vitaminas, minerales y fibra.

Por lo anterior, para este trabajo se planteó como objetivo, estudiar la Relación de Eficiencia Proteica (ganancia en peso en función de la calidad de la proteína consumida en la dieta), y la absorción de calcio, fósforo y magnesio en hueso, así como la determinación de la cristalinidad y resistencia a la fractura de los huesos en tortillas provenientes de dos métodos de nixtamalización, el tradicional y el ecológico.

METODOLOGÍA

Preparación de harinas y tortillas

La elaboración de tortillas por el proceso tradicional de nixtamalización se realizó de la siguiente manera, 1 kg de maíz fue colocado con 2 L de agua y 1% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, los cuales fueron expuestos a 90 °C por 40 min, y reposados por 12 h. Enseguida, el agua de cocimiento fue drenada y el maíz cocido se lavó tres veces para eliminar el exceso de cal, con una posterior molienda en molino de piedras. La masa fue moldeada en formas circulares y cocidas a 180 °C por 1 min. Para el método ecológico de nixtamalización que se empleó para este trabajo, las condiciones de nixtamalización fueron similares, solamente variando la cantidad de sulfato de calcio añadida, la cual fue de 1.8% y solamente fue sometida a un lavado para eliminar el exceso de sulfato de calcio.

Caracterización química del maíz blanco y tortillas

Al maíz sin procesar y a las tortillas obtenidas por los procesos ecológico y el tradicional y la harina instantánea Maseca® se les realizaron los análisis de: humedad, proteínas, cenizas y lípidos usando los métodos de la AACC (6). La fibra dietética se analizó con el método de Prosky y col. (7).

Ensayo biológico

Elaboración de las dietas

Con base a la composición química del maíz y de las tortillas se formularon las dietas experimentales en concordancia a la Dieta AIN-93G que está establecida para ratas en crecimiento (8), obteniéndose las siguientes cinco dietas: i) Dieta de maíz sin procesar (DB); ii) Dieta de tortillas de maíz elaboradas con el método ecológico de nixtamalización (DE); iii) Dieta de tortillas de maíz preparadas con el método tradicional de nixtamalización (DT); iv) Dieta de tortilla elaboradas con la harina instantánea Maseca® (DM); v) Dieta control de caseína (DC). Las dietas fueron lo más isocalóricas e isoproteicas posibles, y variaron en su contenido de calcio, el cual fue proporcionado por cada una de las fuentes usadas como materia prima. A las cinco dietas elaboradas se les realizaron los análisis de su composición química para verificar que todas tuvieran el mismo contenido de nutrientes.

Distribución y manejo de los animales de experimentación

Para el experimento, se utilizaron ratas macho Wistar, de 22 días de nacidas, y un peso comprendido entre 47 y 63 g; éstas se mantuvieron en adaptación durante dos días con alimento comercial y agua *ad libitum*. Al tercer día, grupos de seis ratas fueron asignadas al azar para cada una de las cinco dietas experimentales. Las ratas se instalaron en jaulas individuales. Las condiciones ambientales que se mantuvieron fueron: temperatura de 22 °C y 12 h de luz artificial por 12 h de oscuridad en ambiente aislado de ruidos. Las dietas experimentales y el agua fueron suministrados *ad libitum* a los animales por 28 días. Se llevó un registro del peso corporal desde el inicio del experimento hasta su etapa final, a intervalos de 7 días. El consumo de alimento se determinó pesando la dieta consumida, la dieta sobrante y la dieta tirada durante todo el ensayo. Se calculó el peso ganado y la proteína consumida a los 28 días por rata de cada grupo. La relación de eficiencia proteica (PER) se calculó dividiendo el aumento de peso de la rata entre el peso de la proteína consumida. Se promedió el PER de cada grupo. Se reporta la calidad de la proteína de prueba como la relación porcentual del PER de la muestra respecto al PER de la caseína de referencia. Se corrigió el valor del PER del alimento de prueba asumiendo que el PER de la caseína permanece constante en un valor de 2.5. Al término de los 28 días de experimento se sacrificaron los animales mediante una dislocación cervical. A cada animal se le extrajeron ambos fémures de cada ejemplar por cada grupo. Los fémures se limpiaron con ayuda de un bisturí y un paño impregnado de alcohol, para dejarlo limpio de tejido muscular. Las mediciones de los huesos (longitud, espesor y diámetro medio) fueron realizadas con un Vernier. El peso del fémur se cuantificó en base seca. La resistencia del

hueso a la fractura se relaciona con la cantidad de calcio retenido en el tejido óseo de las ratas. Para la medición se usó el Texturómetro TA-XT2 (Texture Technologies Corporation, Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra). En esta prueba se usó una cuchilla plana de 5 mm de espesor que se conectó al brazo sensor del equipo. Para ocasionar la fractura del hueso, la cuchilla se desplazó a una velocidad de 2 mm/s con una fuerza de 0.100 kg y una profundidad de 10 mm. Se reportó la cantidad de fuerza requerida para fracturar el hueso en g/mm. Para medir la fuerza de compresión sobre el fémur también se usó el mismo equipo Texturómetro TA-XT2 (Figura 4), en el cual se determinó la fuerza máxima necesaria para la penetración (2 mm) sobre el material, la sonda fue una punta (90°), la cual se desplazó a una velocidad de 1 mm/s sobre el fémur de los animales sin necesidad de fracturarlo.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los huesos

Se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido ESEM XL30 PHILIPS, con un haz de electrones ajustado a 20Kv y 50 μ A de corriente. Dos fémures de cada grupo de dieta fueron cortados transversalmente y sujetos dentro de una pastilla de acrílico para lo cual se empleó un Kit AcryFix, los huesos fueron sujetos con cintillas de acrílico al momento de la elaboración de las pastillas. Estas fueron pulidas con una lija de agua para dejar expuesta el corte transversal del fémur y se les asignó una letra (A y B) para los fémures de la dieta de maíz blanco sin procesar, (C y D) dieta de tortilla Maseca®, (E y F) dieta de tortilla tradicional, (G y H) dieta de tortilla ecológica y (I y J) dieta control de caseína; las pastillas se montaron en una placa de observación y se escaneó con el microscopio electrónico, las imágenes fueron digitalizadas y procesadas con el software para análisis de imágenes (IMAGE J).

Calcio, magnesio y fósforo en huesos

Las mediciones de calcio y magnesio se realizaron en un espectrofotómetro de Absorción Atómica (AA) PerkinElmer Modelo: AAnalyst 200. El fósforo se midió de acuerdo a NMX-AA-029-SCFI-2001. Este método se basó en la reacción del fósforo contenido en la muestra como ortofosfato con el ácido molíbdico para formar el ácido 12-molibdofosfórico. El ácido 12-molibdofosfórico fue reducido por el cloruro de estaño a azul de molibdeno, compuesto de composición desconocida que contiene una mezcla de Mo (VI) y Mo (V), que absorbe a 690 nm. La intensidad del color azul formado depende de la concentración de fosfatos adicionados al heteropoliácido. La materia orgánica de la muestra fue destruida por medio de una digestión con persulfato de amonio y ácido sulfúrico, rompiendo las ligaduras orgánicas del fósforo (C-P y/o C-O-P), e hidrolizando los polifosfatos a ortofosfatos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización química del maíz y tortillas

Para evaluar la calidad nutricional del maíz blanco sin procesar (MB) y de las tortillas elaboradas con el método ecológico de nixtamalización (TE), método tradicional (TT) y con harina instantánea Maseca® (TM) se les realizó un análisis químico proximal (Tabla 1). En la determinación de cenizas los valores oscilaron entre 1.07% y 1.39%, encontrándose que no hubo diferencia estadística significativa entre la TT y la TE, esto es importante resaltarlo ya que aun cambiando la fuente de calcio en el proceso de nixtamalización no interfirió en el contenido de minerales presentes en la tortilla. Según Pflugfelder y col. (9), el contenido de calcio en la masa estará en función de la concentración inicial de cal, la temperatura de cocción, del tiempo de remojo y las características del maíz. En la determinación de extracto etéreo el valor más bajo lo tuvo la TM siendo su valor de 2.57%, la cual no fue significativamente diferente con la TT, al presentar 2.63%; lo anterior debido a que se utilizaron condiciones similares en el proceso de nixtamalización empleado; la TE y MB si tuvieron una diferencia estadística significativa entre ambas y con respecto a las dos anteriores, siendo los valores de 3.06% y 4.66%, respectivamente. El valor encontrado para MB entra en el rango (4.2%-5.2%) reportado por Bressani y col. (10); en cuanto a los valores de extracto etéreo en tortilla todos entran en el rango (0.8%-3.8%) reportado por Ranhotra (11). En esta determinación se observó que hubo un incremento significativo de compuestos liposolubles en la TE en comparación con la TT y con la TM. Para proteína, el valor más alto lo tuvo MB el cual fue de 8.90%, muy parecido al rango reportado (9.1%-11.3%) por Bressani y col. (1990); y este valor fue el único que presento diferencia estadística diferente de las demás. En cuanto al contenido de fibra total en las muestras, el MB tuvo un valor de 12.09% y no fue estadísticamente diferente a la TE, la cual presento un valor

de 11.57%; aunque si fueron diferentes estadísticamente significativas de las medias obtenidas con la TT y con la TM, que fueron de 5.32% y 4.76%, respectivamente; las cuales a su vez no presentaron diferencia estadística significativa. Todos estos valores fueron similares a los reportados por Bressani y col. (10) y Ranhotra (11). Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y se obtuvo el promedio y a las repeticiones se les realizó un análisis de ANOVA y una Prueba de Tukey con $\alpha=0.05$, para una comparación de medias.

Tabla 1. Composición química del maíz blanco sin procesar (MB), tortilla elaborada con el método ecológico de nixtamalización (TE), tortilla elaborada con el método tradicional de nixtamalización (TT) y tortilla elaborada con harina instantánea Maseca® (TM).

Determinación (%)	MB	TE	TT	TM
Humedad	11.51 ^a	39.61 ^b	40.94 ^c	41.33 ^d
Cenizas	1.07 ^b	1.14 ^{ab}	1.31 ^{ab}	1.39 ^a
Extracto etéreo	4.66 ^a	3.06 ^b	2.63 ^c	2.57 ^c
Proteína	8.90 ^a	7.96 ^b	7.48 ^b	7.37 ^b
Fibra insoluble	10.26 ^a	9.78 ^a	4.35 ^b	3.90 ^b
Fibra soluble	1.83 ^{ab}	1.79 ^{ab}	0.97 ^{bc}	0.86 ^c
Fibra total (FI + FS)	12.09 ^a	11.57 ^a	5.32 ^b	4.76 ^b
Extracto libre de nitrógeno	49.87	25.09	37.00	37.82

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). (n=4). Extracto libre de nitrógeno = $100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ fibra dietética} + \% \text{ extracto etéreo})$.

Ensayo biológico

Para cerciorarse de que todas las dietas a probar tuvieran semejanza en su composición química, se les realizaron los análisis de composición química (Tabla 2). Los valores de cenizas oscilaron entre 3.48-3.5%, no encontrándose diferencia estadística entre las dietas provenientes del maíz y de las tortillas; para la dieta control de caseína (DC) el valor fue de 4.16% y si fue diferente estadísticamente de las demás dietas, probablemente porque para la preparación de la dieta control se empleó una mezcla de minerales en la cual se incluía el calcio y para las demás dietas se utilizó una mezcla de minerales libre de calcio. El valor de 3.5% de minerales se tomó como referencia de la Dieta AIN-93G (8) para ratas en crecimiento, donde se cuida la relación Ca:P para evitar patologías en el riñón de los animales. En cuanto a extracto etéreo, la Dieta AIN-93G recomienda un 7% para ratas en crecimiento, principalmente por estas últimas condiciones, en nuestro trabajo se ajustaron las dietas a 4% que es la recomendación de lípidos para mantenimiento normal del animal. Los valores para extracto etéreo de las dietas provenientes del maíz y de las tortillas no presentaron diferencia estadística entre ellos, a la dieta Control si se le agregó 7% ya que esta dieta es considerada un control de crecimiento dentro del experimento.

Tabla 2. Composición química de la dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Determinación (%)	DB	DE	DT	DM	DC
Cenizas	3.49 a	3.50 a	3.50 a	3.48 a	4.16b
Extracto etéreo	4.19 a	4.17 a	4.03 a	3.92 a	7.10c
Proteína	7.62b	7.77b	7.27 a	7.10 a	20.36c
Fibra insoluble	8.79c	9.35d	4.05 a	3.90 a	5.06b
Fibra soluble	1.57b	1.70b	0.93 a	0.83 a	1.06c
Fibra total (FI + FS)	10.32c	11.07d	4.98 a	4.73 a	6.12b
Extracto libre de nitrógeno	62.51	62.29	68.88	69.33	51.82

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). (n=4) Extracto libre de nitrógeno = $100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ fibra dietética} + \% \text{ extracto etéreo})$

Para el contenido de proteína el valor más alto se observó para la dieta control de caseína (DC) 20.36% ya que es la recomendación de caseína en la dieta AIN-93G (8) que se utilizó de referencia. A las demás dietas se les respetó el porcentaje de nitrógeno proteico que tenían, todas alrededor de 7% sin presentar diferencia significativa entre ellas. Los valores para fibra total en las dietas provenientes del maíz y de las tortillas se diluyeron un poco al prepararse las dietas, conservándose la similitud al no presentar diferencia estadística significativa entre la dieta de tortilla tradicional y la dieta de tortilla Maseca®; las demás dietas presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellas, pero todas a excepción de la dieta de tortilla Maseca® están dentro del 5% recomendado en la dieta AIN-93G.

Ganancia en peso durante el ensayo biológico y PER

En la Tabla 3 se muestra la ganancia en peso durante los 28 días de experimentación por grupo de dieta; y se observa que no hay diferencia estadística significativa entre las dietas experimentales. En cuanto al consumo de alimento, durante el ensayo se observó diferencia significativa entre el consumo por parte del grupo de la DC y el del grupo de la DM, con un consumo promedio de 411.06 g y 338.45 g, respectivamente; referente a las demás dietas, la DE, la DT y la DB no hubo diferencia significativa entre ellas, ni con respecto a las DC y DM. En relación al consumo de calcio, se observó una diferencia estadística significativa entre sí entre todas las dietas experimentales; el consumo mayor de calcio fue por parte de los grupos alimentados con la DC con 73.40 mg/día, la DT con 17.27mg/día, la DE con 12.93 mg/día, la DM con 8.35 mg/día y la DB con 0.77 mg/día; esto se debe que el aporte de calcio presentes en las dietas DT, DE, DM, y DB no se ajustó y se mantuvo el contenido original de calcio contenido en las tortillas y el maíz, de los cuales se partieron para elaborar las dietas. El valor más alto de PER fue el del grupo de la DC (2.2), tal como se esperaba, pues esta dieta se considera un control de crecimiento; las ratas alimentadas con las dietas DT, DE y DM presentaron valores de PER de 1.85, 1.81 y 1.74, respectivamente, y no tuvieron diferencia estadística significativa entre sí; sin embargo, si tuvieron ambas una diferencia parcialmente significativa en relación al PER de la DM, quien tuvo un valor de 1.74; el PER de la DB fue el más bajo del ensayo (1.49).

Tabla 3. Ganancia en peso y PER de los animales, alimento y calcio consumido durante los 28 días del ensayo. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Dietas	Ganancia total de peso (g)	Alimento total consumido (g)	Calcio total consumido (mg)	PER
DC	167.61 a	411.06 a	73.40 a	2.2a
DE	51.68b	345.52ab	12.93c	1.81b
DT	48.03b	335.49ab	17.27b	1.85b
DM	44.3b	338.45b	8.35d	1.74bc
DB	41.14b	354.26ab	0.77e	1.49c

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). (n= 6)

Al término del ensayo, a los animales se les retiro el alimento y se sacrificaron. A cada animal se le extrajeron 2 los fémures, los cuales se limpiaron con un bisturí y un paño impregnado de alcohol, para dejarlo limpio de tejido muscular y enseguida se caracterizó físicamente. Las mediciones de longitud, espesor, diámetro medio y peso, se observan en la Tabla 4. En cuanto al peso del fémur de los animales por grupo de dieta, la tendencia que se observo fue la siguiente: los fémures de las ratas alimentadas con la DC fue quien registro el mayor peso (0.32g) siendo estadísticamente diferente al resto de las dietas; en seguida los pesos de los fémures de las ratas alimentadas con las dietas DE y DT fueron de 0.20g y 0.19g, respectivamente, y fueron estadísticamente diferentes a todas las demás dietas, pero no entre sí; por último, los valores más bajos en cuanto a peso (g) del fémur, fueron para los animales alimentados con las dietas DM (0.15g) y DB (0.11g), valores que fueron estadísticamente diferentes entre sí y con respecto a las demás dietas del ensayo. Para el parámetro de longitud del fémur de los animales de las diferentes dietas experimentales, no se observó ninguna diferencia significativa notoria entre ellas, cayendo todos los valores dentro del rango de 2.49 a 2.57cm; sólo los fémures de las ratas alimentadas con la DC presentó el valor más alto de longitud de fémur (2.97cm), el cual fue diferente significativamente al de las demás dietas experimentales. Para el siguiente parámetro a discutir, se observó que los animales alimentados con las dietas DC presentaron el mayor valor de espesor medio del fémur (0.34 cm), resultando diferente significativamente del resto de las dietas y, el valor más bajo lo obtuvo el grupo de DB (0.25cm), con diferencia estadísticamente significativa al resto de las dietas. Quedando sin diferencia notoria entre sí, solo con respecto a los valores de los fémures de las ratas alimentadas con las dos dietas antes mencionadas, las DT, DE y DM con 0.29cm todas ellas. Los valores obtenidos al realizar la medición de diámetro medio del fémur (fémur-pelvis), siguieron la misma tendencia que la medición de longitud de éste, no encontrándose diferencia significativa entre las dietas DT, DE, DM y DB, solo DC tuvo diferencia estadística significativa con respecto a las demás dietas, mostrando esta última el valor más alto (0.74cm) y para el resto oscilaron los valores entre 0.62 y 0.67cm.

Tabla 4. Peso, longitud, espesor y diámetro medio de los fémures de cada grupo de dieta. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Dietas	Peso(g)	Longitud (cm)	Espesor medio (cm)	Diámetro medio Fémur-pelvis (cm)
DC	0.32a	2.97 ^a	0.34a	0.74 ^a
DE	0.20b	2.57b	0.29b	0.67b
DT	0.19b	2.50b	0.29b	0.65b
DM	0.15c	2.50b	0.29b	0.65b
DB	0.11d	2.49b	0.25c	0.62b

Medias con distinta letra en la misma columna tienen una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) ($n = 6$).

Fuerza al corte de los huesos de ratas

En relación a la fuerza (g/mm) requerida para fracturar el fémur de los animales de manera transversal, los únicos valores que fueron diferentes del resto, fueron los de la DC (Tabla 5), obteniendo el valor más alto en fuerza requerida para fracturar el fémur, siendo de 1808.76 g/mm; en cuanto a los demás datos aunque existió una diferencia de 50.25% entre los datos obtenidos de la DE y la DB que fueron los datos más altos y los más bajos para las dietas experimentales, no se observó diferencia significativa debido a que los datos presentaron una desviación estándar alta entre ellos.

Tabla 5. Parámetros para la medición y fuerza requerida para fracturar los fémures de cada grupo de ratas. Dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT), dieta de tortilla Maseca® (DM) y dieta Control de caseína (DC).

Dietas	Velocidad (mm/s)	Distancia (mm)	Fuerza (kg)	Fuerza requerida Para fractura (g/mm)
DC	2	10	0.1	1808.76a
DE	2	10	0.1	1149.14b
DT	2	10	0.1	1087.35b
DM	2	10	0.1	910.48b
DB	2	10	0.1	577.52b

Medias con distinta letra en la misma fila tienen una diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). ($n = 6$).

Microscopía electrónica de barrido (SEM) en hueso

La dieta de tortilla ecológica de nixtamalización (DE) a pesar de contener un 5.12% menos calcio que la dieta de tortilla tradicional de nixtamalización (DT) no presentó diferencia significativa en el grosor en el hueso cortical de los fémures, siendo ambos de 0.33mm de grosor, ni en fuerza requerida para su compresión, esto quiere decir que aun siendo menor el contenido de calcio en la DE éste puede resultar ser más biodisponible para el organismo. En cuanto al grosor de los fémures de la dieta de tortilla Maseca® (DM) tuvo un valor por debajo de DE y DT 0.30mm y 0.28mm de la dieta de maíz blanco sin procesar (DB) siendo este último el grosor menor de todas las dietas. El grosor del hueso cortical esta dado principalmente por la fase inorgánica del hueso, y le confiere

dureza y resistencia al hueso (12). Si tomamos como referencia normal de grosor nuestra DC (0.48mm), la DT y DE alcanzan el 68.75% del grosor normal, debido a que la tortilla aun siendo una muy buena fuente de calcio, ya que aporta 49.1% de los requerimientos diarios recomendados (800–1000 mg/día). Nuestras dietas fueron hechas en base a maíz y tortilla, respetando el contenido de calcio de cada tortilla; por tanto, los huesos de DT, DE, DM y DB no alcanzaran las dimensiones y características de los DC. Sin embargo, el grosor de los fémures de DT y DE si superaron a los encontrados para DM y DB, 0.30 y 0.28, respectivamente.

El grano de maíz no es considerado una fuente de calcio, por el contrario, su cantidad es muy baja (7.12 mg/100g), esto pudo ser evidenciado en este trabajo debido a que la micrografía (50 μm) de la DB presento en la superficie del corte, zonas de resorción ósea muy marcadas las cuales se observan en la Figura 1 dentro de óvalos de color verde; estas anomalías observadas en este trabajo y en base a soporte bibliográfico fueron caracterizadas como osteopenia intracortical (Figura 2), la cual se caracteriza por la producción de estriaciones o áreas radiolúcidas longitudinales corticales (13). En cuanto a la micrografía (50 μm) de DC en ella se observan sitios de resorción y formación de huesos normales; para DT y DE se observan mayores sitios de resorción que de formación, y para DM la micrografía señala sitios de resorción más ampliamente distribuidos y escasos sitios de formación. Por otra parte, la micro sonda de análisis elemental del microscopio electrónico, también nos dio a conocer la composición elemental de la superficie del hueso, la cual se observa en la Tabla 12. En la cual el mayor contenido de calcio en hueso, lo presentó DC 8.80%, en seguida DT y DE con una diferencia entre ellas de 0.09%, con 7.67% y 7.58% respectivamente, para DM 7.34%, con una diferencia de 0.33% con respecto a las dos anteriores, y por último DB con 6.68% de calcio presente en el hueso.

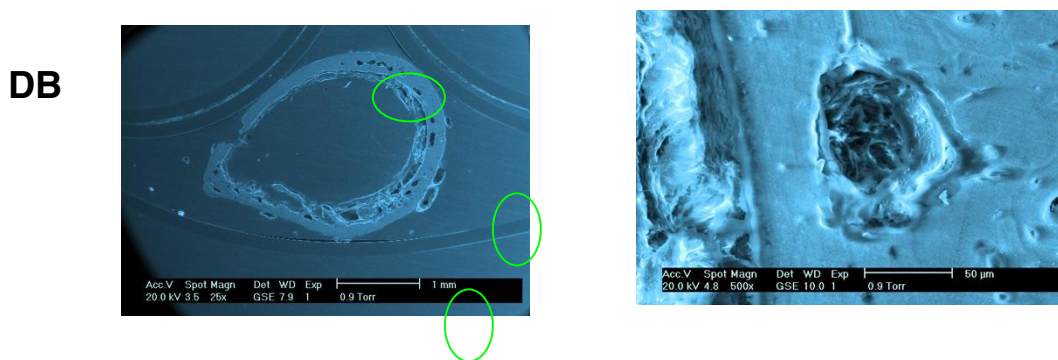


Figura 1. Micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de maíz blanco sin procesar (DB) y a la derecha se observa un sitio de resorción ósea anormal (50 μm).

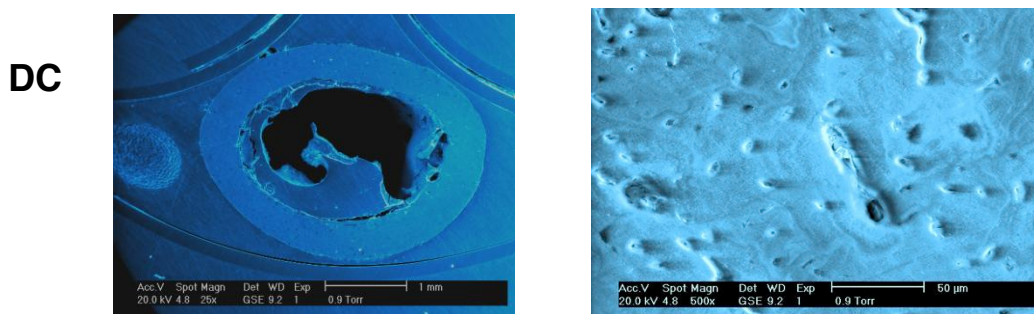


Figura 2. Micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta control de caseína (DC). A la derecha se observan sitios de resorción y formación ósea normales (50 μm).

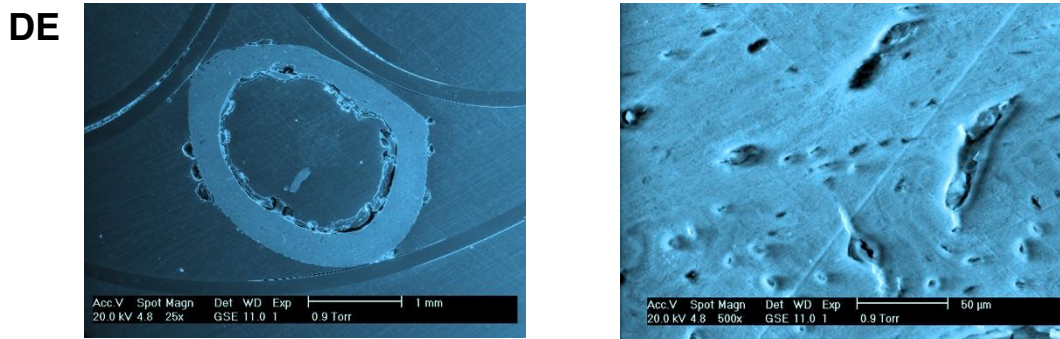


Figura 3. Micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla ecológica (DE) y a la derecha se observan varios sitios de resorción ósea (50 µm).

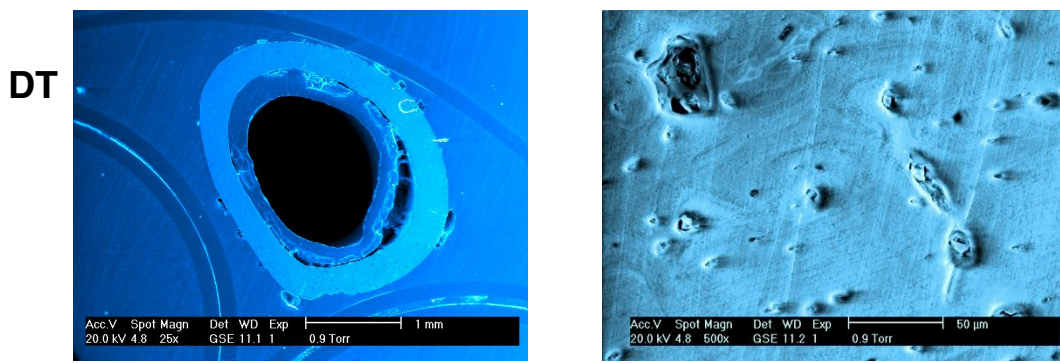


Figura 4. Micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla tradicional (DT) y a la derecha se observa varios sitios de resorción ósea (50 µm).

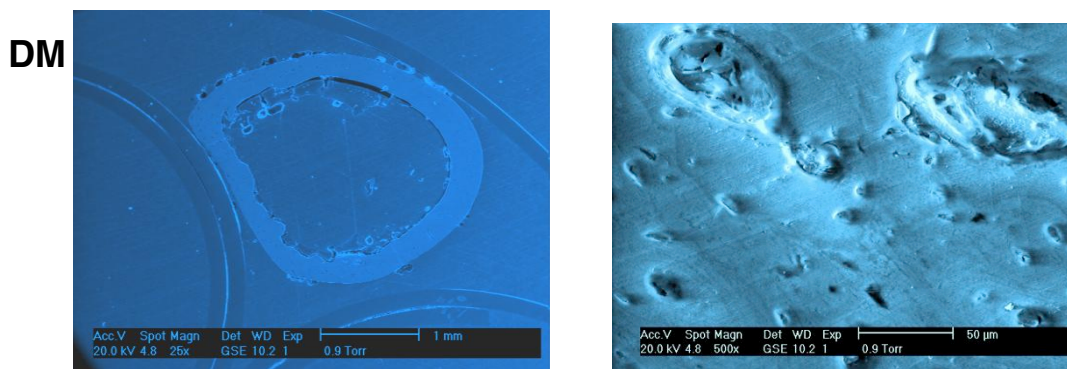


Figura 5. Micrografía de un corte transversal del fémur de una rata alimentada con dieta de tortilla Maseca® (DM) y a la derecha se observan varios sitios de resorción ósea (50 µm)

Calcio, magnesio y fósforo en hueso

Los huesos de las ratas alimentadas con la DC registró la mayor concentración de calcio y fósforo, siendo de 248.67 mg/g y 149.97 mg/g de hueso, respectivamente, obteniendo así la mejor relación Ca:P (1.65), siendo esta última importante debido a que este equilibrio está relacionado con la asimilación y fijación de ambos minerales en hueso. En cuanto al contenido de calcio en los fémures de las ratas alimentadas con las demás dietas (DT, DE, DM y DB) si existió una diferencia

significativa entre ellas. Siendo los provenientes de la DT la que obtuviera el mayor contenido de calcio con respecto a las anteriores, 157.49 mg/g en hueso, enseguida con una pequeña diferencia de 5.12% con respecto a DT quedaron los provenientes de la DE, la cual si resultó superior a los provenientes de la DM la cual quedo con una diferencia de 22.90% por debajo de DE los provenientes de la y 26.40% por debajo de los provenientes de la DT y de los provenientes de la DB quedo por debajo de todas las dietas con 34.81 mg/g. En fósforo se observó la misma tendencia que para el calcio, la mayor registrada para nuestras dietas experimentales fue en los huesos de las ratas alimentadas con la DT con 84.50 mg/g en hueso, la cual nos da una relación Ca:P de 1.86, para la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DE se observa una disminución de 5.96% con respecto a la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DT, pero mantiene una buena relación de Ca:P (1.88); en cuanto a la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DM esta resultado con una diferencia respecto a la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DT de 29.72% y 1.94 en la relación Ca:P y por último la absorción de fósforo en hueso de ratas alimentadas con la DB obtuvo el valor más bajo de fósforo en hueso siendo de 33.44% menor a DT, y con una relación Ca:P de 0.63. En cuanto a la ingesta elevada de fosfatos se ha descrito que se puede favorecer el desarrollo de la osteoporosis, especialmente cuando la ingesta de calcio es baja, como es el caso del grupo de dieta DB, ya que actualmente se recomienda que la relación Ca/P sea igual a 1 o superior, considerándose relaciones inferiores a 1 como un factor desencadenante de la pérdida de masa ósea (14). El contenido de magnesio en los animales alimentados con las diferentes Dietas experimentales (DC, DE, DT, DM y DB) se observan también en la Tabla 6 y entre ellos al igual que el contenido de calcio, también se evidencia una diferencia estadística significativa, para este caso DM presente la mayor concentración de Magnesio en hueso siendo de 5.43mg/g, en cuanto al contenido de magnesio en DT fue 10.86% menor con respecto al DM; DC también resulto menor con 15.83%, DE 27.80% menor también con respecto a DM y por ultimo DB fue el contenido de magnesio más bajo encontrado en el ensayo biológico siendo de 0.17mg/g. El magnesio (Mg) es un componente en el hueso que desempeña un papel en el metabolismo del calcio (Ca) y la fuerza del hueso, posiblemente por cambios hormonales.

Tabla 6. Contenido de calcio y magnesio en fémur de ratas alimentadas con dieta de maíz blanco sin procesar (DB), dieta de tortilla ecológica (DE), dieta de tortilla tradicional (DT) y dieta de tortilla Maseca® (DM).

Determinación	DB (mg/g)	DE (mg/g)	DT (mg/g)	DM (mg/g)	DC (mg/g)
Calcio*	34.81e	149.42c	157.49b	115.20d	248.67a
Magnesio*	0.17e	3.92d	4.84b	5.43 ^a	4.57c
Fósforo	56.24	79.46	84.50	59.38	149.97
Ca:P	0.63	1.88	1.86	1.94	1.65

Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. (P < 0.05).
* Espectroscopia de absorción Atómica (n=2). Fósforo determinado mediante NMX-AA-029-SCFI-2001.

CONCLUSIONES

Las tortillas preparadas por el método ecológico tuvieron resultados similares a las obtenidas por el proceso tradicional de nixtamalización, ya que mostraron capacidades de absorción de calcio que permitieron tener huesos con la misma resistencia a la fractura y dimensiones físicas medidas, en fémures de ratas alimentadas con ambas dietas. Ambos fémures también no mostraron evidencias

de presentar osteopenia, por lo que se considera que la sustitución de hidróxido de calcio por el sulfato puede ser un método ecológico factible de ser utilizado como una alternativa relacionada con el uso de tecnología más limpia y de manejo sustentable.

BIBLIOGRAFÍA

1. D. McKenzie, "Are tortillas a Giften Good in Mexico?", *Econ Bull.*, vol. 15, 1, 2002, pp. 1-7.
2. M.N. Khan, Rooney, L.W., Rosenow, D.T., Miller, F.R., "Sorghums with improved tortilla making characteristics", *J. Food Sci.*, Vol. 45, 5, 1980, pp. 720-725.
3. H.E. Martínez-Flores, Martínez-Bustos, F., Figueroa, C.J.D., González-Hernández, "Studies and Biological Assays in Corn Tortillas Made From Fresh Masa Prepared by Extrusion and Nixtamalization Processes", *J. Food Sci.*, Vol. 67, 3, 2002, pp. 1196-1199.
4. H.E. Martínez-Flores, Figueroa, C.J.D., Martínez-Bustos, F., González-Hernández, J., Rodríguez, G.M.E., Baños López, A.M.L., Garnica-Romo, M.G., "Physical properties and composition of femurs of rat fed with diets based on corn tortillas made from different processes", *Int. J. Food Sci. Nutr.*, Vol. 53, 2002b, pp. 158-160.
5. J.D. Figueroa-Cárdenas, Rodríguez-Chong A, Véles-Medina JJ. 2006. "Proceso ecológico de nixtamalización para la producción de harinas masas y tortillas integrales". Patente mexicana PA/a/2005/011797.
6. AACC. 2000. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists 10th ed. The Association, St. Paul, MN.
7. L. Prosky, Asp, Nils-Georg., Scheizer, F.T., DeVries, W.J., Furda, I., "Determination of Insoluble, Soluble and total Dietary Fiber in Foods and Food Products: Interlaboratory Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 71, 5, 1988, pp. 1017-1023.
8. P.G. Revees, "Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet", *J. Nutr.*, Vol. 127, 5, 1997, pp. 838S-841S.
9. R.L. Pflugfelder, Rooney, L.W., Waniska, R.D., "Dry matter losses in commercial corn masa production", *Cereal Chem.*, Vol. 65, 1988, pp. 127-132.
10. R. Bressani, Benavides, V., Acevedo, E., Ortiz, M.A., "Changes in Selected Nutrient Contents and in Protein Quality of Common and Quality-Protein Maize During Rural Tortilla Preparation", *Cereal Chem.*, Vol. 67, 6, 1990, pp. 515-518.
11. G.S. Ranhotra, "Nutritional profile of corn and flour tortillas"; *Cereal Food World*, Vol. 30, 10, 1985, pp. 703-704.
12. S. De S.J., Soto, M.C., Fandiño, F.L.E., De Larrauri, L., "Banco de huesos y tejidos Fundación Cosme y Damián", *Acta de Otorrinolaringología & Cirugía de Cabeza y Cuello*, Vol. 35, 2, 2007, pp. 58-64.
13. J.R. Zanchetta, Talbot, J.R., "Osteoporosis. Fisiopatología, Diagnóstico, Prevención y Tratamiento", 2001, Editorial Médica Panamericana S.A.,
14. D. Teegarden, Lyle, R.M., McCabe, G.P., McCabe, L.D., Proulx, W.R., Michon, K., Knight, A.P., Conrad, J.C., Weaver, C.M., "Dietary calcium, protein, and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women", *Amer. J. Clin. Nutr.*, Vol. 68, 1998, pp. 749-754.

EFFECTO DEL ISOPROPIL- β -D-TIOGALACTOPIRANÓSIDO (IPTG) SOBRE EL CRECIMIENTO Y CONSUMO DE GLUCOSA EN DOS CEPAS DE *Escherichia coli* MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

Alhee Olivarez-Cano ¹, Fernando Astudillo-Melgar ¹, Daysi Navez-González ², José Raunel Tinoco-Valencia ³, Gerardo Huerta-Beristáin ¹

¹ Facultad de Ciencias Químico Biológicas – UAGro, Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Guerrero. México, C.P. 39090. ² Unidad de Investigación Especializada en Microbiología – UAGro, Av. las colinas S/N. Petaquillas, Guerrero. México. C.P. 39105. ³ Unidad de Planta piloto, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos, México.
Email.: hbgerardo@gmail.com

RESUMEN

El isopropil- β -d-tiogalactopiranosido (IPTG) es un compuesto químico utilizado para controlar la expresión de genes homólogos o heterólogos bajo regulación de promotores de tipo *lac* o híbridos como *trc*, con el objetivo de incrementar la producción de proteínas o metabolitos de interés. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la concentración del IPTG sobre la velocidad específica de crecimiento y de consumo de glucosa de *E. coli* KO11 *pgi* y *E. coli* KO11 E35 transformadas con el plásmido pPHB_{Av} (que contiene los genes *phbB*, *phbA* y *phbC* de *A. vinelandii* bajo la regulación del promotor *trc*), en cultivos con medio mínimo M9 suplementado con 10 g/L de glucosa, a 37°C y 130 rpm. Las concentraciones de IPTG analizadas fueron 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mM. Como controles se usaron cultivos con las cepas bacterianas sin adición de IPTG. La máxima velocidad específica de crecimiento (μ) en *E. coli* KO11 *pgi*/pPHB_{Av} y *E. coli* KO11 E35/pPHB_{Av} se obtuvo con 0.05 mM ($\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$) y 0.1 mM de IPTG ($\mu = 0.27 \text{ h}^{-1}$), respectivamente. La q_s más elevada se obtuvo con 1.0 mM de IPTG en cultivos con *E. coli* KO11 *pgi*/pPHB_{Av} ($4.3 \text{ g}_{\text{Glc}}/\text{g}_{\text{DWC}} \text{ h}^{-1}$) y con 0.05 mM de IPTG con KO11 E35/pPHB_{Av} ($1.25 \text{ g}_{\text{Glc}}/\text{g}_{\text{DWC}} \text{ h}^{-1}$). Estos resultados sugieren que la concentración óptima para expresión de genes *phbB*, *phbA* y *phbC* heterólogos en *E. coli* KO11 *pgi*/pPHB_{Av} y *E. coli* KO11 E35/pPHB_{Av} es 0.05 mM y 0.1 mM de IPTG, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

E. coli es uno de los sistemas microbianos más empleado para incrementar la expresión de genes homólogos o heterólogos, debido a que se conoce su metabolismo, regulación genética y posee una elevada velocidad específica de crecimiento. Las estrategias son: a) introducción de genes heterólogos en el genoma de *E. coli*, lo que lo hace un sistema estable pero con bajo número de copias del gen y en consecuencia la proteína a expresar. b) uso de plásmidos con diferentes características para obtener gran cantidad de copias de los genes. Los plásmidos de expresión son moléculas de ADN extracromosomal, con las siguientes características: 1) Un origen de replicación, 2) región de regulación de la expresión, formado por el gen de la proteína represora y el promotor, 3) gen de resistencia a antibiótico (marcador de selección), 4) sitio múltiple de clonación, etc. Además existen plasmidos que no contienen promotores, donde se pueden expresar genes que contengan sus propios promotores.

Algunos sistemas de expresión genética en bacterias se fundamentan en el sistema del operon *lac* de *E. coli*. El operón *lac* es responsable de producir las proteínas que controlan el metabolismo de la lactosa para su uso como fuente de energía y de carbono, consiste de tres genes estructurales y un gen represor. La proteína represora *lacI* impide la expresión de los genes anteriores. Es por ello que se usan inductores gratuitos como el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). El IPTG es un compuesto químico utilizado para regular la expresión de genes que están bajo regulación de promotores de tipo *lac* o híbridos como *trc*. El promotor *trc* contiene la región -35 del promotor *trp* y la región -10 del promotor *lac*.

Dos cepas derivadas de *E. coli* KO11, son KO11 *pgi* y KO11 E35, estas tienen inactivada la vía glucolítica, en consecuencia todo el flujo de carbono del metabolismo se canaliza hacia la vía de las pentosas. La cepa *E. coli* KO11 *pgi* no crece en condiciones anaerobias debido a que no tiene la capacidad para reciclar el NADP⁺ por tanto se acumula el NADPH, el cual inhibe el crecimiento celular. La cepa *E. coli* KO11 E35 se obtuvo mediante un proceso de evolución adaptativa de KO11

pgi, la cual recuperó su capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas. En el presente trabajo estas cepas fueron transformadas con el plásmido pPHB_{Av} derivado de pTrc99A que contiene los genes *phbB*, *phbA* y *phbC* que codifican para las enzimas de síntesis de β-poli-hidroxibutirato (PHB de *A. vinelandii* bajo regulación del promotor *trc* (Centeno-Leija *et al.*, 2014).

TEORIA

Escherichia coli

E. coli es un bacilo gramnegativo, oxidasa negativo, con un tamaño promedio de 1.1-1.5 μm de ancho y 2.0 - 6.0 μm de largo. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobios facultativos y pueden ser móviles por la presencia de flagelos peritricos o no móviles (Scheutz y Strockbine, 2005). El crecimiento de *E. coli* muestran cuatro fases durante su cinética de crecimiento (Fase de adaptación, exponencial o logarítmica, estacionaria y de muerte), relacionadas a su comportamiento celular y metabólico.

Regulación de la expresión genética

Promotores inducibles

La expresión de genes se puede llevar a cabo por dos mecanismos: 1. Mediante promotores inducibles en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo señales endógenas y factores físicos y químicos externos, bajo condiciones experimentales controladas, lo que significa que siempre hay algún represor presente para inhibir la actividad promotora o que un promotor tiene baja actividad (unión a ARN polimerasa) hasta que esté presente un activador. (Gatz y Lenk, 1998). Y 2 promotores constitutivos, los cuales están regulando la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para el mantenimiento y el metabolismo celular. La principal ventaja de estos promotores es que generalmente promueven altos niveles de expresión (Park *et al.*, 2010; Jorde, 2005).

Operón *lac*

Un operón es una unidad de expresión genética y un sistema regulado transcripcionalmente. El operón *lac* es responsable de producir las proteínas que controlan el metabolismo de la lactosa para su uso como fuente de energía y de carbono cuando la glucosa no está disponible para la célula. Consiste de tres genes estructurales y un gen represor. Las enzimas requeridas para la utilización de lactosa codificadas por el operón son las siguientes: Bajos: β-galactosidasa, lactosa permeasa y tiogalactósido transacetilasa. La proteína represora *lac* impide la expresión de los genes anteriores.

Promotor *trc*

Es un híbrido del operon *trp* y el operon *lac*, que contiene la región -35 del promotor *trp* y la región -10 del promotor *lac* (Amann *et al.*, 1988). Además, el Promotor *trc* mantiene su característica de ser inducible por Isopropil-β-D-Tiogalactopiranosido (IPTG) (Fernández y Hoeffler, 1999).

Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN, que en su mayoría son continuos y bicatenarios; debido a que tienen su propio origen de replicación, se replican independientemente del cromosoma y se mantiene de forma autónoma al cromosoma del hospedero. Su tamaño oscila entre 1 – 500 kb y de 1-30 copias por célula (Lorenzo, 2010). Para que un plásmido se pueda utilizar como vector de expresión, debe tener tres características importantes: 1) Un origen de replicación, 2) región de regulación de la expresión, formado por un gen que codifica para una proteína represora (*LacI*) y el promotor, 3) gen de resistencia a antibiótico (marcador de selección), 4) sitio múltiple de clonación, etc.

La proteína represora *lacI* impide la expresión de los genes que estén bajo regulación del promotor. Para activar la expresión se usan inductores gratuitos como el IPTG. Estos sistemas han sido empleados para incrementar la producción de proteínas o metabolitos de interés. El IPTG se une a los sitios de unión del inductor de la molécula de represor *lacIq*, causando el cambio conformacional, pero no es hidrolizado por acción de la β-galactosidasa inducida, por lo tanto, afecta al sistema sin que ellos mismos sean alterados (metabolizado) por este (Devlin, 2014).

Cepas de *E. coli* KO11 derivadas *E. coli* KO11 *pgi* y KO11 E35

En un trabajo publicado por Huerta-Beristáin *et al.*, 2017 reportaron dos cepas derivada de *E. coli* KO11, KO11 *pgi* y KO11 E35, que tienen inactivada la vía glucolítica, las cuales canalizan todo el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas. La cepa *E. coli* KO11 *pgi* no crece en condiciones anaerobias debido a que no tiene la capacidad para reciclar el NADP⁺ acumulándose NADPH, el cual inhibe el crecimiento celular. Por otro lado las mutantes en KO11 *pgi* tienen una gran limitación

del transporte de glucosa, causada por la rápida degradación del transcrito de *ptsG* por la RNAsa e inducida por la acumulación de Glucosa-6-fosfato, reduciendo la generación de biomasa. Por evolución adaptativa se obtuvo la cepa *E. coli* KO11 E35, la cual se recuperó su capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas. Las cepas fueron transformadas con el plásmido pPHB_{Av} derivado de pTrc99A que contiene los genes *phbB*, *phbA* y *phbC* de *A. vinelandii* bajo regulación del promotor *trc* (Huerta Beristain *et al.*, 2017).

Plásmido pPHB_{Av}

El plásmido pPHB_{Av} es derivado de pTrc99A (plásmido que contiene el promotor fuerte *trc* inducible por IPTG, y el gen represor *lacI^q*). El plásmido pPHB_{Av} contiene los genes, *phbA*, que codifica para la β-Cetotiolasa, que cataliza la conversión de acetyl-CoA en acetoacetyl-CoA; *phbB* el cual codifica para la acetoacetyl-CoA reductasa, que cataliza la conversión de acetoacetyl-CoA y NADPH en D-β-hidroxi-butiril-CoA más NADP⁺ y *phbC* que codifica para una PHB sintasa que lleva a cabo la polimerización de las subunidades de D-β-hidroxi-butiril-CoA en β-poli-hidroxi-butirato (Centeno-Leija *et al.*, 2014).

El poli-β-hidroxi-butirato (PHB)

El polihidroxi-butirato (PHB) es un monómero del cual se conforma el ácido 3-hidroxi-butírico (3HB), el cual tiene 4 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en la posición 3 (Steinbüchel y Valentín, 1995). El PHB y sus copolímeros tienden a ser producidos industrialmente desde 1982 en sustitución a los plásticos a base de petróleo (Ojumu *et al.*, 2004).

PARTE EXPERIMENTAL

Cuadro 1. Cepas empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> KO11 <i>pgi</i> ^r	<i>E. coli</i> W <i>pfl::pdc adhB cat,Δfrd,Δpgi</i>	Huerta-Beristain <i>et al.</i> , 2017.
<i>E. coli</i> KO11 E35	<i>E. coli</i> W <i>pfl::pdc adhB, Δfrd, Δpgi</i> . Evolucionada	
Plásmido	Características	Referencia
pPHB _{Av}	Derivado de pTrc99A que contiene los genes <i>phbB</i> , <i>phbA</i> y <i>phbC</i> de <i>A. vinelandii</i> bajo regulación del promotor <i>trc</i> .	Centeno-Leija <i>et al.</i> , 2014

Preparación de cultivos

Se crecieron las cepas en medio sólido de Luria Bertani (LB) y para las cepas transformadas se suplementó con Ampicilina al 100 µg/mL las cajas se incubaron a 37°C por 24 hrs.

Para el inoculo de las cepas *E. coli* KO11 E35, *E. coli* KO11 E35/pPHB_{Av}, *E. coli* KO11 *pgi* y *E. coli* KO11 *pgi*/pPHB_{Av} se empleó el medio mínimo (M9) como fuente de carbono se suplementó con glucosa, ampicilina 100 µg/mL para las cepas con plásmido y se añadió desde el inicio de los cultivos las diferentes concentraciones de IPTG (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM).

Condiciones de cultivo

Se realizaron los cultivos con las siguientes cepas: Como controles se emplearon *E. coli* KO11 E35 y *E. coli* KO11 *pgi*, y las cepas transformadas con plásmidos *E. coli* KO11 E35/ pPHB_{Av}, *E. coli* KO11 *pgi*/ pPHB_{Av}; a las cepas transformadas se les añadió IPTG en diferentes concentraciones. Los cultivos se realizaron en medio M9, para las cepas con plásmidos se empleó Ampicilina a una concentración de 100 µg/ mL, suplementado con glucosa 10g/L. se incubaron en agitación a 130 rpm, a una temperatura de 37°C durante 60 hrs.

Determinación de crecimiento celular

Para determinar biomasa se tomó 1 mL de muestra y se leyó en el biofotómetro (Eppendorf AG 22331, Hamburg) cada seis hrs hasta que la DO_{600nm}. Por cada toma de muestra se obtuvieron sobrenadantes y paquete celular, los cuales se guardaron a -20°C. La velocidad específica de crecimiento se obtuvo durante la fase de crecimiento exponencial con la siguiente fórmula:

$$1. \quad \mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{\Delta t}$$

Determinación de glucosa

La determinación de glucosa se realizó por el método del ácido dinitrosalísico (DNS). El método está basado en la formación de color cuando el reactivo DNS es calentado con algún tipo azúcar reductor. El procedimiento de análisis se realizó poniendo a reaccionar 100 μ L de muestra con 1 mL del reactivo de DNS en tubos de vidrio. Se realizó en baño maría por 10 minutos, después se pasaron los tubos en agua fría para detener la reacción durante 5 minutos, finalmente se realizó la lectura a 570 nm en el espectrofotómetro. Para la velocidad específica de consumo de glucosa fue calculada durante la fase exponencial con la siguiente formula:

$$2. \quad q_s = \frac{y \cdot x/s}{\mu}$$

Curva estándar

El rango de sensibilidad de la curva estándar se realizó de 0 a 1 g/L, a partir de una solución patrón de glucosa.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó Graphpad Prism V.3.0 se realizaron comparaciones de medias y desviaciones estándar de los duplicados hechos en los experimentos.

RESULTADOS

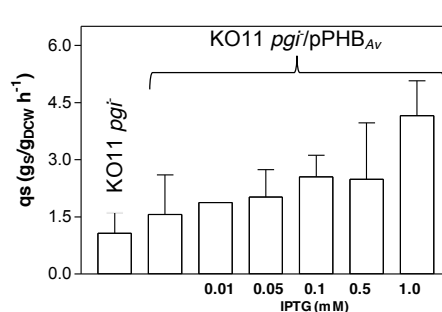
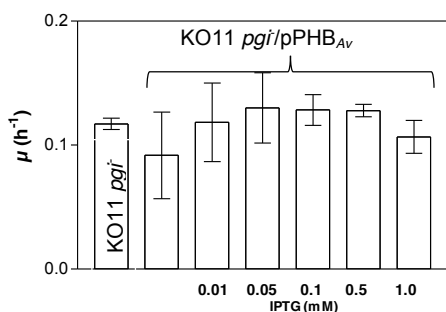
Efecto del IPTG sobre la velocidad específica de crecimiento y de consumo de glucosa en *E. coli* KO11 *pgi*

A) Velocidad específica de crecimiento

Las cepas KO11 *pgi* y KO11 *pgi*/pPHB_{AV} sin IPTG se usaron como controles. Los resultados mostraron que KO11 *pgi*/pPHB_{AV} con 0.05 mM de IPTG tiene un $\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$ y las cepas KO11 *pgi* y KO11 *pgi*/pPHB_{AV} sin IPTG su μ fue de 0.12 h^{-1} y 0.09 h^{-1} respectivamente. Cuando se induce la expresión de los genes heterólogos con concentraciones de 0.01, 0.1, 0.5 y 1.0 mM de IPTG los resultados fueron muy similares.

B) Velocidad específica de consumo de glucosa

A partir de los datos de consumo de glucosa se evaluó la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s). Las cepas KO11 *pgi* y KO11 *pgi*/pPHB_{AV} sin IPTG se usaron como controles. Los resultados indican que las cepas KO11 *pgi*/pPHB_{AV} con las diferentes concentraciones de IPTG mostraron un q_s mayor a la de las cepas control. KO11 *pgi*/pPHB_{AV} con 1.0 mM de IPTG presentó el q_s más elevada ($4.3 \text{ g}_s/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}^{-1}$), mientras que la cepa KO11 *pgi* y KO11 *pgi*/pPHB_{AV} presentaron un q_s de $1.5 \text{ g}_s/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.



(A) Velocidad específica de crecimiento, (B) y de consumo de glucosa de las cepas KO11 *pgi* (control) y KO11 *pgi*/pPHB_{AV} con diferentes concentraciones de IPTG.

(B)

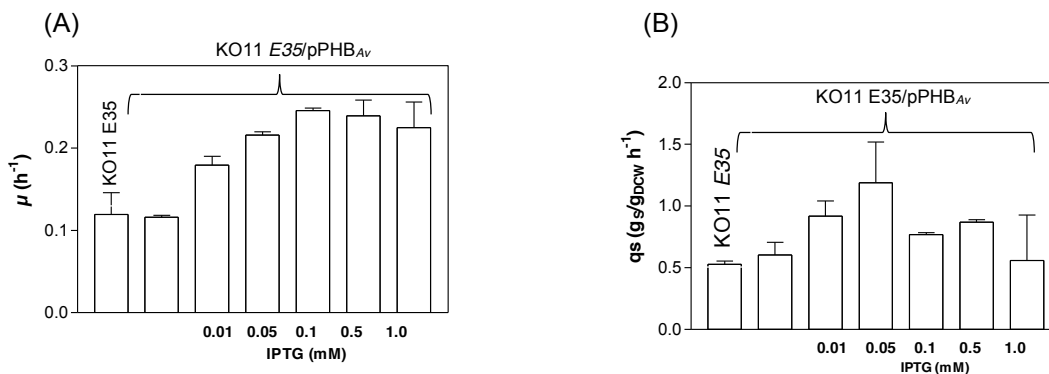
Efecto del IPTG sobre la velocidad específica de crecimiento y de consumo de glucosa en *E. coli* KO11 E35

A) Velocidad específica de crecimiento.

Los resultados de la velocidad específica de crecimiento (μ) y la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s), de *E. coli* KO11 E35 y KO11 E35/pPHB_{AV} sin y con IPTG. Mostraron que, la μ de KO11 E35/pPHB_{AV} con concentraciones de 0.1 a 1.0 mM de IPTG fue de 0.27 h⁻¹ mientras que la de las cepas control fue 0.11 h⁻¹.

B) Velocidad específica de consumo de glucosa

La velocidad específica de consumo de glucosa de las cepas KO11 E35 y KO11 E35/pPHB_{AV} sin IPTG fue de (0.5 g_s/g_{DCW} h⁻¹) mientras que para la cepa KO11 E35/pPHB_{AV} con concentraciones de 0.01 a 1.0 mM de IPTG presentaron valores de q_s entre 0.5- 0.7 g_s/g_{DCW} h⁻¹; excepto con 0.05 mM de IPTG que presentó una q_s mayor (1.25 g_s/g_{DCW} h⁻¹).



(A) Velocidad específica de crecimiento, (B) y de consumo de glucosa de la cepa *E. coli* KO11 E35 (control) y *E. coli* KO11 E35/pPHB_{AV} con diferentes concentraciones de IPTG

CONCLUSIONES

La cepa *E. coli* KO11 *pgi*/pPHB_{AV} con 0.05 mM de IPTG mostró un ligero incremento en la velocidad de crecimiento en comparación con la cepa *E. coli* KO11 *pgi* y en la cepa *E. coli* KO11 E35/pPHB_{AV} con 0.1 mM de IPTG fue la que tuvo mayor crecimiento respecto a la cepa *E. coli* KO11 E35.

La cepa *E. coli* KO11 *pgi*/pPHB_{AV} con 1.0 mM de IPTG presentó la q_s más elevada sin embargo la cepa KO11 E35/pPHB_{AV} con 0.05 mM de IPTG tuvo la mayor q_s de con respecto a los controles.

Respecto a la diferentes concentración de IPTG en el crecimiento para el caso de la cepa *E. coli* KO11 *pgi* con concentraciones bajas se obtiene crecimiento favorables pero también fue esta cepa la que presento la mayor q_s con concentraciones altas del inductor, sucede lo contrario con la cepa *E. coli* KO11 E35 que a partir de 0.01-1.0 mM de IPTG se obtiene un buen crecimiento sin embargo la velocidad específica de consumo de glucosa fue alta cuando se utilizó la contracción de 0.05 de IPTG y en comparación con la cepa *E. coli* KO11 *pgi*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Centeno, S., Huerta, G., Giles, M., Bolivar F, B., Guillermo, G., Martínez, A. (2014). Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105(4): 687-696.
2. Devlin M. Thomas, (2014). Bioquímica: *El repesor del operon lactosa es una proteína difusiva*, Cuarta edición, Editorial Reverte, S.A. España, p. 333.
3. Fernandez M. Joseph, Hoeffler P. James, (1999). Gene Expression Systems: *Expression vectors employing the trc promoter*. Editorial Academic Press. San Diego, California, USA. P. 46-47.
4. Gatz C., y Lenk I., (1998) promoters that respond to chemical inducers, *Trends Plant Sci.*, 3 (1), 352-358.
5. Huerta-Beristáin G., Cabrera-Ruiz R., Hernández-Chávez G., Bolívar F., Guillermo Gosset y Martínez A. (2017). Metabolic engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* KO11

- for ethanol production through the Entner–Doudoroff and the pentose phosphate pathways. *Chem Technol Biotechnol.* 92(5). Pp.990.996.
6. Jorde B. Lynn, (2005). Genética Médica; *Transcripción y regulación de la expresión génica*, Tercera Edición, Editorial ELSEVIER, Madrid, España. P. 13.
 7. Ojumu, T., Yu, J., Solomon, B. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of biotechnology.* 3: 18-24.
 8. Park S., Yi N., Kim Y., Jeong M., Bang S., Do Y., y Kim J. (2010). Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *J Exp Bot.*, 61 (9), 2459-2467.
 9. Scheutz F. y Strockbine N.A. Genus I. (2005) *Escherichia*. In: Brenner, D.J., et al. (Eds.). The Proteobacteria Part B *The Gammaproteobacteria*. Springer. (Part B) 607-623.

LANTANO EN LA CONCENTRACIÓN FOLIAR DE CLOROFILAS EN TRES VARIEDADES DE ALCATRAZ

Nadia Issaí Torres-Flores¹, Libia I. Trejo-Téllez¹, Gabriel Alcántar-González¹, Fernando C. Gómez-Merino¹, Brenda I. Trejo-Téllez², Prometeo Sánchez-García¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ²Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. e-mail: nadia.torres@colpos.mx

RESUMEN

En esta investigación se evaluaron los efectos de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3] y cuatro concentraciones de éstas (0, 10, 20 y 30 μM) en las concentraciones de clorofila a, b y total en hojas de tres variedades de alcatraz (Gold Fever, Regal y Garnet Glow), al momento de la cosecha. Cada variedad tuvo cuatro tratamientos con cinco repeticiones y la unidad experimental fue una planta en una bolsa de polietileno negro con una mezcla de tezontle y agrolita como sustrato. Las fuentes y dosis evaluadas fueron adicionadas a la solución nutritiva Steiner al 50%; se realizaron tres riegos semanales de 200 mL por unidad experimental, durante el ciclo de cultivo. En la variedad Gold Fever el tratamiento con 20 μM LaCl_3 incrementó la concentración de clorofila a, b y total en 29, 82 y 42 % comparado con el testigo, respectivamente. En la variedad Regal, la concentración foliar de clorofila a y total aumenta en plantas tratadas con 10 μM LaCl_3 en 14 y 20%, respectivamente; mientras que, la clorofila b aumenta en 91% en el tratamiento con 20 μM $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. En la variedad Garnet Glow, plantas tratadas con 30 μM $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tuvieron 11% más de clorofila a; la clorofila b y total fue mayor con el tratamiento con 30 μM LaCl_3 , en 65 y 12%. Respecto a las concentraciones y fuentes evaluadas se obtuvo que en las tres variedades hubo diferencias estadísticas significativas. Se concluye que la fuente $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ incrementa las concentraciones foliares de clorofila en dos de las tres variedades.

INTRODUCCIÓN

En el país, el Estado de México destaca como uno de los principales productores de flor de corte: con una superficie sembrada del 25% del total dedicada a la floricultura nacional, exportando el 80% de las ornamentales, cuyo destino principal son los Estados Unidos de América (Orozco y Mendoza, 2003). En México, se cultiva principalmente el alcatraz blanco (*Zantedeschia aethiopica* (L.) K. Spreng) a cielo abierto en ambientes templados y húmedos, sin embargo la experiencia agronómica con otros cultivares es limitada (Cruz-Castillo *et al.*, 2008).

Elementos como aluminio (Al), cerio (Ce), cobalto (Co), yodo (I), sodio (Na), lantano (La), selenio (Se), silicio (Si), titanio (Ti) y vanadio (V), pueden mejorar indicadores de crecimiento y desarrollo, por lo que se les ha clasificado como elementos benéficos (Gómez-Merino *et al.*, 2015). En particular, los elementos de las tierras raras (ETR) se consideran benéficos para el metabolismo vegetal, entre ellos se encuentra el La (Andrés *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el La afecta distintos procesos y reacciones fisiológicas, así como absorción, transporte y asimilación nutricional (Tyler, 2004).

Una de las variables que se deben tomar en consideración para determinar el estatus fisiológico de las plantas en un momento determinado es el contenido de clorofila, responsable de la coloración verde de las hojas (Steele *et al.*, 2008). El contenido de clorofila se encuentra altamente asociado a las concentraciones de nitrógeno en las hojas (Callejas *et al.*, 2013).

En el contexto anterior, este trabajo plantea como objetivo la evaluación de las concentraciones foliares de clorofilas a, b y totales en tres variedades de alcatraz (Gold Fever, Regal y Garnet Glow), al momento de la cosecha, en respuesta a dos fuentes y cuatro concentraciones de La aplicadas en la solución nutritiva de Steiner.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue en condiciones de invernadero, en la cual se utilizaron rizomas de alcatraz de la variedad Gold Fever, Regal y Garnet Glow, adquiridos en la empresa Floraplant, S. A. de C. V. Se utilizó como sustrato una mezcla de tezontle de 5-8 mm + Agrolita® (70/30, v/v), en bolsas de polietileno negro de 30 x 30 cm, donde se plantó un rizoma por bolsa, considerándose como una unidad experimental. Previo a la plantación se realizó una desinfección de los rizomas con una solución de Cupravit® + Promyl® a razón de 2 y 1 g L⁻¹ de agua, respectivamente, durante 15 min

para prevenir enfermedades fungosas. Inmediatamente después los rizomas se introdujeron en una solución de 100 mg de ácido giberélico L⁻¹ por 15 min para favorecer la floración. Los tratamientos de La evaluados fueron suministradas en la solución nutritiva de Steiner al 50% (Steiner, 1984). La aplicación de los tratamientos se inició 15 días después de la plantación (ddp), aplicando 200 mL por bolsa tres veces por semana. El diseño de tratamientos utilizado fue factorial 4 X 2 con un arreglo completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Por tanto, se evaluaron ocho tratamientos, resultado de la combinación de cuatro concentraciones de La (0, 10, 20 y 30 μ M) y de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3].

Las determinaciones se realizaron en hojas obtenidas al momento de la cosecha de cada variedad: Gold Fever a los 112, Regal a los 97 y Garnet Glow 82 (ddp) en promedio para las dos fuentes aplicadas; siguiendo la metodología de una triple extracción etanólica. La concentración de clorofilas foliares a y b se determinaron, leyendo los extractos a 635 y 645 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6715; Staffordshire, UK) y sustituyendo los datos en las siguientes formulas: Clorofila a = $(12.7 \cdot A_{663}) - (2.59 \cdot A_{645})$; Clorofila b = $(22.9 \cdot A_{645}) - (4.70 \cdot A_{663})$ y Clorofila total = $(8.2 \cdot A_{663}) + (20.2 \cdot A_{645})$. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (LSD, $P \leq 0.05$ %) empleando el software Statistical Analysis System (SAS, 2002).

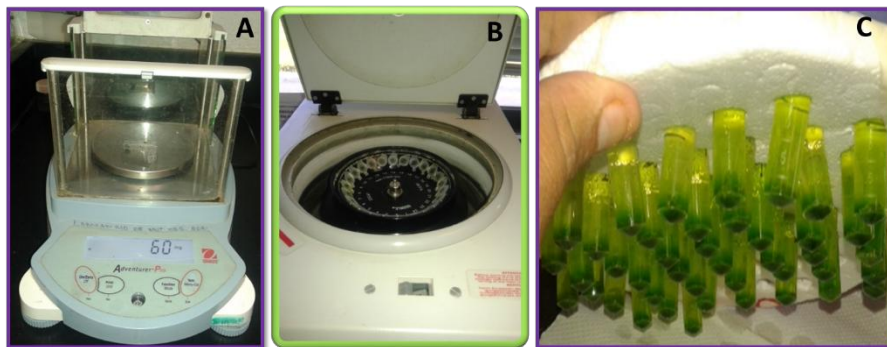


Figura 1. A) Pesado de la muestra, B) Centrifugado de las muestras y C) Tercera extracción etanólica de las muestras en hojas de las tres variedades de alcatraz, para la determinación de las clorofilas a, b y total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la variedad Gold Fever la concentración de clorofila a, b y total fue mayor con el tratamiento de 20 μ M LaCl_3 en un orden del 29, 82 y 42 % comparado con el testigo, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efectos de los tratamientos con La en la solución nutritiva de Steiner al 50%, en la concentración de clorofilas en hojas de alcatraz var. Gold Fever en la cosecha

Tratamiento	Fuente	Concentración (\square M)	Clorofila a Clorofila b Clorofila total (\square g mg^{-1} de peso fresco)					
			1	La Cl_3	0	1.692	c	0.323
2	10	2.061	ab		0.480	bc	2.541	b
3	20	2.191	a		0.589	a	2.860	a
4	30	1.968	b		0.524	ab	2.472	bc
5	La $(\text{NO}_3)_3 6\text{H}_2\text{O}$	0	1.692	c	0.323	d	2.015	e
6		10	1.770	c	0.370	d	2.141	d
7		20	1.707	c	0.330	d	2.037	de
8		30	1.976	b	0.400	cd	2.376	c

Medias con letras distintas en cada columna, son diferentes estadísticamente (LSD, $P \leq 0.05$).

En la variedad Regal, la concentración foliar de clorofila a y total aumenta en plantas tratadas con 10 \square M LaCl_3 en 14 y 20%, respectivamente; mientras que, la clorofila b aumenta en 91% con el tratamiento de 20 \square M $\text{La}(\text{NO}_3)_3 6\text{H}_2\text{O}$ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efectos de los tratamientos con La en la solución nutritiva de Steiner al 50%, en la concentración de clorofilas en hojas de alcatraz var. Regal en la cosecha.

Tratamiento	Fuente	Concentración (\square M)	Clorofila a Clorofila b Clorofila total (\square g mg^{-1} de peso fresco)					
			1	La Cl_3	0	2.072	bc	0.289
2	10	2.355	a		0.487	ab	2.842	a
3	20	1.573	d		0.257	d	1.830	c
4	30	1.443	d		0.358	cd	1.801	c
5	La $(\text{NO}_3)_3 6\text{H}_2\text{O}$	0	2.072	bc	0.289	d	2.361	b
6		10	2.250	ab	0.478	ab	2.728	a
7		20	1.887	c	0.551	a	2.438	b
8		30	1.915	c	0.414	bc	2.329	b

Medias con letras distintas en cada columna, son diferentes estadísticamente (LSD, $P \leq 0.05$).

En la variedad Garnet Glow, hojas de plantas tratadas con 30 \square M $\text{La}(\text{NO}_3)_3 6\text{H}_2\text{O}$ tuvieron una concentración de clorofila a, clorofila b y total superior en 11, 65 y 12%, respectivamente, a la registrada con el tratamiento con 30 \square M LaCl_3 . Se observó un efecto negativo en la concentración de clorofilas con el tratamiento de 20 \square M LaCl_3 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efectos principales de los tratamientos con La en la solución nutritiva de Steiner al 50%, en la concentración de clorofilas en hojas de alcatraz var. Garnet Glow en la cosecha.

Tratamiento	Fuente	Concentración (μ M)	Clorofila a				Clorofila b		Clorofila total	
			(μ g mg ⁻¹ de peso fresco)							
1	La Cl ₃	0	1.575	b	0.310	cd	1.885	b		
2		10	1.554	b	0.337	bc	1.891	b		
3		20	1.342	c	0.236	d	1.579	c		
4		30	1.601	b	0.510	a	2.110	a		
5	La (NO ₃) ₃ 6H ₂ O	0	1.575	b	0.310	cd	1.885	b		
6		10	1.658	ab	0.423	ab	2.081	a		
7		20	1.571	b	0.451	a	2.022	ab		
8		30	1.751	a	0.315	cd	2.067	a		

Medias con letras distintas en cada columna, son diferentes estadísticamente (LSD, $P \leq 0.05$).

En la variedad Gold Fever, las concentraciones de clorofilas a, b y total fueron incrementadas de manera significativa en los tratamientos con La, respecto al testigo. En la variedad Regal, la concentración foliar de clorofilas fue incrementada con el tratamiento 10 μ M La. Finalmente, en la variedad Garnet Glow fue la máxima concentración de La aumentó las concentraciones foliares de clorofilas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto principal de la concentración de La, en la concentración foliar de clorofilas en tres variedades de alcatraz Gold Fever, Regal y Garnet Glow.

Variedad	Concentración (μ M)	Clorofila a		Clorofila b		Clorofila total	
		(μ g mg ⁻¹ de peso fresco)					
Golden Fever	0	1.915	b	0.323	b	2.015	c
	10	1.915	a	0.425	a	2.341	b
	20	1.949	a	0.459	a	2.448	a
	30	1.972	a	0.462	a	2.424	ab
Regal	0	2.072	b	0.288	c	2.361	b
	10	2.302	a	0.482	a	2.785	a
	20	1.729	c	0.404	b	2.134	c
	30	1.678	c	0.386	b	2.065	c
Garnet Glow	0	1.575	a	0.310	c	1.885	bc
	10	1.606	a	0.380	ab	1.986	b
	20	1.456	b	0.343	bc	1.800	c
	30	1.675	a	0.412	a	2.088	a

Medias con letras distintas en cada columna, son diferentes estadísticamente (LSD, $P \leq 0.05$).

En la variedad Gold Fever la mejor fuente fue LaCl₃, mientras que para las variedades Regal y Garnet Glow la mejor fuente de La fue La (NO₃)₃ 6H₂O (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto principal de la fuente de La, en la concentración foliar de clorofilas en tres variedades de alcatraz Gold Fever, Regal y Garnet Glow.

Variedad	Concentración (□M)	Clorofila a		Clorofila b		Clorofila total	
		(□g mg ⁻¹ de peso fresco)					
Golden Fever	La Cl ₃	1.978	a	0.478	a	2.472	a
	La (NO ₃) ₃ 6H ₂ O	1.786	b	0.356	b	2.142	b
Regal	La Cl ₃	1.861	b	0.347	b	2.208	b
	La (NO ₃) ₃ 6H ₂ O	2.030	a	0.433	a	2.464	a
Garnet Glow	La Cl ₃	1.518	b	0.348	a	1.866	b
	La (NO ₃) ₃ 6H ₂ O	1.638	a	0.375	a	2.013	a

Medias con letras distintas en cada columna, son diferentes estadísticamente (LSD, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIÓN

Se concluye que la fuente La(NO₃)₃ 6H₂O incrementa estadísticamente las concentraciones foliares de clorofila en dos de las tres variedades de alcatraz estudiadas (Regal y Garnet Glow); mientras que, la variedad Gold Fever es favorecida por la aplicación de LaCl₃. Asimismo, se observa efecto positivo del La en la concentración foliar de clorofilas.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Steiner, "The universal nutrient solution", *in*: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. 1984. pp. 633-649.
2. F. C. Gómez Merino; L. I. Trejo Téllez; C. Cuacua Temiz; M. Á. Jácome Chacón y H. E. Senties Herrera. Los elementos benéficos: potencial para innovar la producción agrícola. Agroentorno. 2015. N° 166. Año 18. 19-20.
3. G. Tyler. Rare earth elements in soil and plant systems: A review. *Plant Soil* 2004. 267: 191-206.
4. J.G. Cruz-Castillo; P. A. Torres Lima; M. Alfaro Chimalhua; M. L. Albores González y J. Murguía González. Lombricompostas y Apertura de la Espata en Poscosecha del Alcatraz "Green Goddess" (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) en Condiciones Tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 2008. 14(2): 207-212.
5. M. E. Orozco Hernández y M. Mendoza Martínez. Competitividad local de la agricultura ornamental en México. Universidad Autónoma del Estado de México. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. *Ciencia Ergo Sum*. 2003. 10(1): 28-42.
6. M. Steele; A. Gitelson and D. Rundquist. A comparison of two techniques for nondestructive measurement of chlorophyll content in grapevine leaves. *Agronomy Journal*. 2008.100 (3): 779-782.
7. R. Callejas; E. K. Américo Contreras; C. Peppi y L. Morales. Evaluación de un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de variedades de uva de mesa. *Idesia*. 2013. 31(4):19-26.
8. SAS. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide. (Vol. 1 & 2). Cary, NC: SAS Institute Inc. Ver. 9). 2002. 652 p.
9. Y, Andrès; A. C. Texier and P. Le Cloirec. Rare earth elements removal by microbial biosorption: A review. *Environ. Technol*. 2003. 24: 1367-1376.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LA PULPA DEL *Nephelium lappaceum* Y *Litchi chinensis*

Maritza Rosas Vasquez, Francisco Abelardo Cen Pancheco, Rodolfo Quintana Castro y María Guadalupe Sánchez Otero

Universidad Veracruzana

RESUMEN

El estrés oxidativo dentro de las células ocasiona un desequilibrio que puede provocar daño en diversas biomoléculas desencadenando daños fisiológicos; los antioxidantes tanto endógenos como exógenos son fundamentales para proteger al organismo de los radicales libres. El consumo de antioxidantes exógenos es de extrema relevancia y son además de fácil acceso como parte de la dieta diaria como frutos y verduras, entre los primeros se encuentran algunos frutos no nativos de México que presentan un alto potencial antioxidante. La capacidad antioxidante de un compuesto depende de sus propiedades redox, de su capacidad como quelante de metales prooxidantes, como donador de hidrógeno y como captor de radicales libres. Por ello, El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante de la pulpa de rambután (*Nephelium lappaceum*) y Lichi (*Litchi chinensis* Soon) cultivados en México.

MÉTODO: La pulpa de ambos frutos se sometió a extracción con metanol (1:3), los extractos se secaron en rotaevaporador para concentrar. Posteriormente, 100 mg de cada extracto se disolvieron en 1 mL de metanol y se les evaluó la capacidad de captura de radicales libre utilizando DPPH, y el contenido de Fenoles totales por el método de Folin. La pulpa de Lichi presentó una capacidad de captura de radicales libres equivalente a 30.4 mg de Ácido gálico/100g pulpa y el rambután 11.7mg de AG/100 g pulpa, y un contenido de fenoles equiv. a 230.99 g AG/100 g pulpa y el rambután 51.46 g AG/100 g pulpa. Por lo que la pulpa de estas frutas cultivadas en el estado de Veracruz es una potencial fuente compuestos con actividad antioxidante y nutracéutica que deberán ser purificados y elucidados.

INTRODUCCIÓN

Como parte del metabolismo y debido a factores internos y externos al organismo puede existir la condición conocida como estrés oxidativo que se caracteriza por un desequilibrio en la producción y eliminación de los radicales libres, esto como consecuencia de la disminución de los niveles de las defensas antioxidantes celulares, del aumento de la velocidad de producción de las especies reactivas, o en ciertas ocasiones puede ser resultado de ambas condiciones.¹ Este estrés puede ocasionar daño en diversas biomoléculas tales como DNA, proteínas y lípidos de membrana, que a su vez puede desencadenar daños fisiológicos. Existen dos vías fundamentales para proteger a la célula del daño que pueden generar los radicales libres: la vía endógena y la vía exógena. La vía endógena requiere apoyo externo, y por ello es que se recomienda el consumo de antioxidantes exógenos cuya ingesta es de fácil acceso ya que forman parte de nuestra dieta diaria². El consumo se realiza primordialmente a partir de frutos y verduras, semillas y otros alimentos, pero es en muchos de los frutos nativos y no nativos de nuestro país donde hay una fuente inagotable de estos compuestos. Esta reportado que el consumo de frutos no nativos en México pero ya cultivados aquí, aportan moléculas que tienen potencial antioxidante, entre ellos vitamina C, compuestos fenólicos y carotenos³. Un paso inicial para predecir el potencial antioxidante de los alimentos, así como purificarlos de manera dirigida es la determinación de la capacidad antioxidante de estos *in vitro*. La capacidad antioxidante de un compuesto depende de sus propiedades redox, de su capacidad como quelante de metales prooxidante, como donador de hidrógeno y como captor de radicales libres⁴, esta capacidad variará no sólo de acuerdo a su estructura química, sino a la forma en el que se encuentra en el alimento y el estado en el que se encuentra al consumirlo en la dieta diaria; sino que también se modificará por las condiciones de cultivo, por ello las variedades de estos frutos no nativos, no necesariamente tendrán la misma composición de esta misma especie cultivadas en su país o región de origen.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante de la pulpa del *Nephelium lappaceum* y *Litchi chinensis* cultivados en México.

TEORÍA

Frutos no nativos en México con potencial nutraceútico

El término nutraceútico se le conoce a los componentes nutricios de los alimentos, estos pueden ser compuestos esenciales y no esenciales producidos en la naturaleza siendo parte de la cadena alimentaria, y que proveen al ser humano de beneficios para la salud o para la prevención de ciertas patologías. En pocas palabras el potencial nutraceútico radica principalmente en la presencia de metabolitos secundarios no nutricionales (muchos de ellos de origen vegetal) que son esenciales para la salud humana. Entre los compuestos nutraceútico que se encuentran en frutas tropicales podemos encontrar a la vitamina E, vitamina C, carotenos y compuestos fenólicos.⁵ Entre los efectos benéficos se le han atribuido a su poder antioxidante y captación de radicales que ayudan a retrasar o inhibir la oxidación del DNA, proteínas y lípidos, además de efectos antimicrobianos, ya que ayudan a la protección de las frutas frente a los agentes patógenos, penetrando la membrana celular de microorganismos causando la lisis.⁶, está determinada por compuestos antioxidantes con diferentes mecanismo de acción ya que pueden unirse a polímeros biológicos, como lo son las enzimas, hormonas transportadoras y DNA; así como quelar iones metálicos, catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres.⁵

Nephelium lappaceum

Nephelium lappaceum, comúnmente conocido como Rambután es un fruto de color rojo, con pulpa blanca de sabor y olor característico, está cubierto por una cascara áspera con unos pelos suaves que lo caracteriza y tiene una forma ovalada. La pulpa de los frutos maduros tiene un rango de sólidos solubles de 17 a 21%, la acidez expresada como ácido cítrico de la misma es de 0.7 a 5.5%, posee un pH de 4 a 5 y su componente principal es el agua, la cual constituye un 82% de la pulpa. Aporta además, Vitamina C y minerales como potasio y magnesio.⁶ La clasificación taxonómica es la siguiente:⁷

Clase	<i>Magnoliophyta</i>
Subclase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Sapindales</i>
Familia	<i>Sapindaceae</i>
Genero	<i>Nephelium</i>
Especie	<i>Lappaceum</i>

Litchi chinensis

Litchi chinensis es un fruto de color rojo o rosa con una pulpa jugosa de color blanco con su sabor y olor característico, está cubierto por una cascara delgada y áspera con una textura rugosa y tienen una forma ovalada y llegan a medir de 25 a 40 mm. La pulpa de los frutos contienen azúcares de 11.8 a 20.6%, ácidos orgánicos de 0.2 a 1.1% y su componente principal es el agua la cual constituye un 76 a 87% de la pulpa. Aporta vitaminas B y vitamina C y minerales como el calcio, sodio, hierro, potasio, magnesio, fosforo, zinc y magnesio.⁸ La clasificación taxonomía es la siguiente:⁹

Clase	<i>Magnoliophyta</i>
Subclase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Sapindales</i>
Familia	<i>Sapindaceae</i>
Genero	<i>Litchi</i>
Especie	<i>Chinensis</i>

Estrés oxidativo

Como se mencionó anteriormente, el estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio en la producción y eliminación de Especies Reactivas de diferentes elementos (ERs), provocado por la disminución de la respuesta y mecanismos antioxidantes celulares, o el aumento de la velocidad de producción de las especies reactivas.¹ En este proceso intervienen dos tipos de moléculas de especies reactivas: los radicales libres y los no radicales, estas moléculas se forman como resultado del metabolismo celular. Existen especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), estas son originadas en procesos normales como patológicos; existen además otras especies reactivas que son importantes en diversos procesos entre cuales destacan el cloro (RCIS) y bromo (RBrS).¹⁰

Radicales libres

Los radicales libres son moléculas que tienen uno o más electrones desapareados, son reactivos y tienen una corta vida media, estos tienden a secuestrar un electrón de una molécula estable para así lograr su estabilidad¹¹, una vez que el radical logra obtener el electrón de esa molécula, esta se vuelve un radical libre.

Son producidos en nuestro organismo para ayudar a combatir virus y bacterias, sin embargo, son neutralizados los sistemas antioxidantes endógenos, tales como las enzimas catalasa o dismutasa.¹²

Antioxidantes y su medición *in vitro*

Los antioxidantes son moléculas que interactúan antes o durante la reacción en cadena de los radicales libres, ya sea desde la iniciación, propagación, terminación, descomposición o la oxidación de los productos,¹³. Existen antioxidantes de diferente naturaleza química, tales como las vitaminas, los carotenos, como los betacarotenos, alfacarotenos, xantinas y criptoxantinas; los compuestos fenólicos, tales como las isoflavonas, flavonoides, quercetina y polifenoles, estos presentes en diferentes alimentos como pueden ser la cebolla, café, té, frijoles, solo por mencionar algunos.^{14, 15} Para determinar la capacidad antioxidante en los alimentos *in vitro* se debe considerar que esta, estará determinada por la sinergia de diversos compuestos presentes en cada alimento, por lo que debe expresarse en términos de algún estándar o compuesto conocido, tales como al ácido gálico o el Trolox.⁴

Entre los métodos más empleados encontramos la medición de la capacidad de captura de radicales libres con el uso de DPPH (α , α -difeníl- β -picrilhidrazilo), este presenta una estabilidad en ciertas condiciones, este es un radical libre que se obtiene directamente sin una preparación previa, este ayuda a la eliminación de los radicales libres, además de evaluar el potencial antioxidante. Este método se basa en la medición de la capacidad de eliminación de antioxidantes hacia este. El electrón impar del átomo de nitrógeno en DPPH se reduce al recibir un átomo de hidrogeno del antioxidante correspondiente.

Otro método empleado es el de la cuantificación de compuestos fenólicos, con ayuda del reactivo de Folin Ciocalteus. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles.

PARTE EXPERIMENTAL

Se obtuvieron pulpa congelada de *Litchi chinensis* y *Nephelium lappaceum* comercializados en el estado de Veracruz de la cual se utilizó para los extractos, para esto se maceraron 101.0375 gr del primero y 100.4099 gr del segundo, fueron colocados en un matraz con 200 mL de metanol, se dejó reposando por un día, una vez que transcurrió el tiempo, este se filtró para obtener el compuesto, este se colocó en el rotavapor BUCHI R-100 para obtener el extracto libre de agua y metanol. Para evaluar la capacidad antioxidante de ambos frutos fue necesario pesar 1 gramo del extracto obtenido previamente adicionándole 5 mL de metanol, estos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 8 minutos para obtener un sobrenadante el cual fue evaluado.

Método DPPH (α , α -difeníl- β -picrilhidrazilo)

Este método fue utilizado para medir la capacidad de captura de radicales libres de los extractos de la pulpa *Litchi chinensis* y *Nephelium lappaceum*.

Se preparó el DPPH pesando 0.0014 gramos de este reactivo, en un matraz aforado se llevó 10 mL de metanol, de esta solución se tomó 2.5 mL y se volvió a aforar a 25 mL con metanol nuevamente. Se utilizó como estándar Ácido gálico preparado de la siguiente forma, pesando 0.100 gramos de este, en un matraz aforado se llevó a 10 mL de agua destilada, de esta solución se tomó 1 mL y se volvió a aforar a 10 mL, se realizó una curva tipo que va de 0.01 mg/mL a 0.1 mg/mL se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. Para evaluar la capacidad antioxidante de ambos frutos se realizaron diferentes diluciones del sobrenadante del extracto con metanol, estas fueron de 1:5, 1:10 y 1:20

Cuantificación de Fenoles por el Método de Folin-Ciocalteus

Este método fue utilizado para la determinación de fenoles totales y se basa en el poder reductor de este sobre compuestos fenólicos que presenten los extractos de la pulpa del *Litchi chinensis* y *Nephelium lappaceum*.

Se preparó 2 mL del reactivo Folin-Ciocalteu adicionándole 2 mL de agua destilada. Este método requirió la utilización de carbonato de sodio (Na_2CO_3), el cual fue preparado de la siguiente forma, 5 gramos de este reactivo adicionándole 25 mL de agua destilada, esta solución fue disuelta en el agitador magnético para su disolución completamente. Se utilizó como estándar Ácido gálico preparado de la siguiente forma, pesando 0.100 gramos de este, en un matraz aforado se llevó a 10 mL de agua destilada, de esta solución se tomó 1 mL y se volvió a aforar a 10 mL, se realizó una curva tipo que va de 0.01 mg/mL a 0.1 mg/mL se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

RESULTADOS

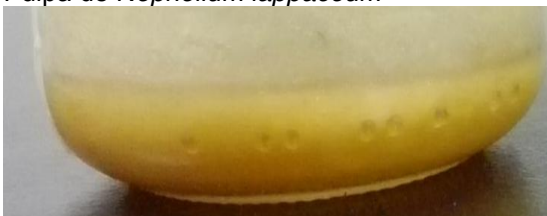
Se pesó 101.0375 gr de pulpa de Litchi chinensis para obtener un extracto de 10.4123 gramos, para el fruto de *Nephelium lappaceum* se pesó 100.4099 gr de la pulpa para así obtener 15.1112 gramos de extracto.



Pulpa de *Nephelium lappaceum*



Pulpa de *Litchi chinensis*



Extracto *Litchi chinensis*



Extracto de *Nephelium lappaceum*

La pulpa de Lichi presentó una capacidad de captura de radicales libres equivalente a 30.4 mg de Ácido gálico/100g pulpa y el rambután 11.7mg de AG/100 g pulpa, y un contenido de fenoles equivalente a 230.99 g AG/100 g pulpa y el rambután 51.46 g AG/100 g pulpa.

Se reporta que los fenoles totales de la pulpa de litchi en condiciones liofilizadas fue de 222.3 mg de AG/100 g de fruta, lo cual en este estudio se obtuvo de 230.99 g AG/100 g de pulpa lo cual está arriba del valor establecido anteriormente. Pero también hay que tener en cuenta que esto puede variar por otros factores como puede ser el cultivar del fruto, en cual al rambután obtuvo un valor menor a comparación de lo antes establecido.¹⁶

En cuanto a la capacidad de captura de los radicales en ambas especies, se asemejan al de la piña ya que este maneja una capacidad de 40.29 ± 5.80 , pero ambas especies se encuentran con valor menor comparación con este fruto.¹⁷

CONCLUSIÓN

Los radicales libres que son generados en el estrés oxidativo son causantes de diferentes patologías causadas en nuestro organismo, además de dañar biomoléculas importantes para la vida. Para detener la proliferación de los radicales libres se han buscado alternativas, una de ellas es el de consumir antioxidantes naturales que encontramos en nuestra dieta diaria en frutos, semillas y vegetales. En esta caso fueron la pulpa de los frutos de *Litchi chinensis* y *Nephelium lappaceum* que fueron evaluados por el método de DPPH y fenoles totales; de cual se encontró que tienen capacidad antioxidante que son los encargados de capturar los radicales libres causantes del estrés oxidativo, esto hace a la pulpa fresca óptima para la disminución de estos radicales, para la prevención de ciertas patologías, así como inhibir el daño de oxidación en el DNA, lípidos y proteínas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Tetteh M, ¿Qué es el Estrés Oxidativo?, [Internet]. Junio 2012. Disponible en: <http://ehscc.umich.edu/wp-content/uploads/OxidativeStressSPN.pdf>
2. Colorado H.M., Vega YL.S., Gutiérrez T.R., Vázquez F.M., Radilla V.C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Nutrición*. 2015. 206 – 208-2010.
3. Zamora S Juan Diego. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev. chilena. Nutrición*. [Internet]. 2007 Mar [citado 2018 Abr 05]; 34(1): 17-26. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100002&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002>.
4. Kuskoski M., Asuero A., Troncoso A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. España. 2005. 727- 729.
5. G. Cárdenas, G. Arrazola y M. Villalba, «Frutas tropicales: fuente de compuestos bioactivos naturales en la industria de alimentos», *Ingenium*, vol. 17, n.º 33, pp. 29-40, julio de 2015.
6. J.F. Ayala, V. Vega, et al. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International* 44 (2011) 1866–1874.
6. A. del ángel, J Adame y T. Villagómez. Características sensoriales y físico-químicas de seis clones de Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), como indicadores del potencial de cultivo en Veracruz, México. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2014, 31: 253-273.
7. Melvin A.T., Calvo V. I. El cultivo de rambután o mamón chino. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica. 2014: 13-15.
8. A. Aguas, E. García, O, Ruíz y A. Trinidad. Calidad de fruto de Litchi (*Litchi chinensis* Sonn) producido en el estado de Veracruz, México.
9. A. de la Garza Núñez. El Litchi: Alternativa para la diversificación frutícola en la huesteca potosina [en línea] 2004 octubre [13 de mayo 2017]; 2: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/792/117.pdf?sequence=1>
10. M. Coronado, S. Vega, R. Gutiérrez, M. Vázquez y C. Radilla. Antioxidantes: perspectivas actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr* Vol. 42, N°2, Junio 2015.
11. L.C. Corrales y M.M. Muñoz. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno.
12. G. Díaz, W. Escobar y E. Estrés Oxidativo cuando el equilibrio se pierde. *Rev Motricidad y persona*, N°3.
13. Dorado M.C., Rugerio V.C., Rivas AS. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac MED UNAM*. Vol.46. Nov-Dic.2003.
14. Avello M., Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Chile. 2006. 161- 169.
15. Avello M., Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Chile. 2006. 161- 169.
16. Sánchez Frías I. R. Diseño y evaluación de un helado del fruto de Litchi chinensis Sonn, adicionado con fibra de avena y bifidobacterias. [Tesis maestría]. México, D.F: Secretaria de investigación y posgrado, escuela nacional de ciencias biológicas, sección de estudios de posgrados e investigación.2009

17. Velderrain Rodríguez G.R. Efecto de la fibra dietaria en la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos de frutos tropicales durante un modelo de digestión *in vitro*. [Tesis maestría]. Hermosillo, Sonora. Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo, A. C. 2013

EVALUACIÓN *In vitro* DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y BIOPESTICIDAS PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea*

J. Guadalupe Callela Hernández, María de la Luz Rojas Sánchez, Douglas Rodríguez Martínez

Investigación Aplicada - Driscoll's México.

RESUMEN

Fueron evaluados 18 biopesticidas, como agentes inhibitorios del crecimiento *in vitro* de seis aislados procedentes de cultivos de *berries* de diferentes zonas de Michoacán y Jalisco. Los microorganismos benéficos se evaluaron mediante enfrentamientos, mientras que para los extractos se desarrolló la técnica de agar envenenado; todos en medio Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés). Los resultados mostraron que dos productos a base de *Trichoderma harzianum* (Bioderma® y Trianum®), así como Peróxido de hidrógeno + plata (Sanosil®) y *Metarhizium anisopliae* (Methazar®) resultaron ser los más eficaces, inhibiendo más del 90% del crecimiento del patógeno. Dos productos a base de *Streptomyces* spp. (383 y A5030), *T. harzianum* (Th-L6®), Extracto de Gobernadora (Progranic Mega®) y Silicato de potasio (Silikare®), mostraron inhibiciones entre 50 y 70%. El resto de los productos a base de *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, Extracto de Neem, algunas cepas de *Streptomyces* spp., Ácido hipocloroso, *Streptomyces lydicus*, Extracto de Cascalote y compuestos de otros microorganismos, resultaron ineficaces. Todos los aislados se comportaron de manera similar entre los productos, excepto RASJL-1 (de frambuesa), que mostró menor porcentaje de inhibición frente a los productos Bioderma® y Methazar®. Este trabajo ofrece alternativas, que una vez validadas en campo, podrían ser utilizadas en los sistemas agrícolas convencionales para reducir el uso de fungicidas químicos, así como por la agricultura orgánica, incrementando la disponibilidad de alternativas eficaces para el control de *B. cinerea*.

INTRODUCCIÓN

Botrytis cinerea Pers. (forma anamórfica) o *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (forma telemórfica) es un hongo fitopatógeno necrotrófico, causante de la enfermedad conocida como podredumbre por moho gris. Esta afecta cualquier etapa de desarrollo de la planta/fruto y se puede mantener en estado de latencia hasta que se presenten las condiciones adecuadas para su crecimiento y desarrollo (Maas, 1998).

En las últimas décadas, las enfermedades vinculadas a este hongo han sido objeto de esfuerzos para desarrollar controladores biológicos que permitan proteger exitosamente los cultivos (Dubos, 1992). Debido a las dificultades asociadas con el control químico (generación de resistencia) y la creciente presión social para reducir el uso de plaguicidas químicos, los métodos alternativos de manejo integrado, han ganado una mayor atención en todo el mundo. Adicionalmente ha existido un impulso considerable en el desarrollo de bioplaguicidas contra éste y otros patógenos (Nicot *et al.*, 2011; Nicot y Bardin, 2012).

El término "bioplaguicida" se refiere a preparaciones basadas en microorganismos vivos (denominados agentes de control biológico o "BCA") y sustancias de origen natural tales como extractos de plantas, microbianos, minerales y compuestos orgánicos (Nicot *et al.*, 2011). Una amplia gama de diferentes grupos de plantas y microorganismos muestran actividad inhibitoria de *B. cinerea* en ensayos de laboratorio e invernadero, pero sólo unos pocos han mostrado un rendimiento constante en campo y algunos otros aún no han sido comercializados (Nicot *et al.*, 2011).

Paralelo al desarrollo comercial de nuevos agentes de control biológico, se ha logrado un progreso considerable en la comprensión de sus modos de acción y en la caracterización de los factores que determinan su eficacia (Nicot *et al.*, 2016). Esto pone de relieve la necesidad de desarrollo de productos bioplaguicidas rentables y que muestren eficacia en las aplicaciones de campo, ya sea para los sistemas agrícolas convencionales o para la agricultura orgánica (Elad y Stewart, 2004). De ahí que este trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia y consistencia de productos de control biológico y biorracionales disponibles comercialmente en la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea in vitro*.

PARTE EXPERIMENTAL*Selección de aislados y preparación de inóculo de *B. cinerea**

Se tomaron seis aislados provenientes de distintas zonas de los distritos de Jalisco y Michoacán, que fueron previamente utilizados en la evaluación *in vitro* de la resistencia a fungicidas químicos (datos no publicados). En la selección se incluyeron aislamientos de diferentes zonas, cultivos y patrones de resistencia a los fungicidas (Tabla I).

Tabla I. Aislados de *B. cinerea* utilizados para la evaluación de la eficacia de productos biológicos y biorracionales.

Aislado	Cultivo	Zona/Distrito	No. de productos químicos a los que fue resistente	Fenotyping a fungicidas químicos
BLJL-1	Arándano	Cd. Guzmán/Jalisco	5	Resistente
STRJL-1	Fresa	Arandas/Jalisco	7	
RASJL-1	Frambuesa	Cd. Guzmán/Jalisco	6	
BLJL-2	Arándano	Tamazula/Jalisco	7	
BKMI-1	Zarzamora	Los Reyes/Michoacán	6	
STRMI-1	Fresa	Tangancicuaro/Michoacán	3	Sensible

Los conidios se obtuvieron a partir de aislados previamente conservados en tubos Eppendorf de 2 ml a -30°C en 40% (vol/vol) de glicerol estéril. Para ello, los aislados se cultivaron en medio de agar dextrosa de papa (PDA, BDBioxon®) + 0.04% de cloranfenicol (SIGMA® Life Science) en placas de Petri de 9 cm de diámetro, durante 10 días a 22 °C con intervalos de 14 horas luz y 10 de oscuridad. La suspensión de conidios se obtuvo por medio de un raspado del micelio y sumergido éste en tubos Eppendorf de 2 ml con agua destilada estéril, eliminando la mayor cantidad posible de micelio, para terminar con una concentración final de 10⁶ conidios/ml. 40 µl de la solución de esporas obtenida, fueron colocados y esparcidos con auxilio de una espátula de Drigalsky en medio PDA, e incubados bajo las condiciones antes mencionadas por tres días. A partir de estos cultivos fueron tomados, con ayuda de un sacabocados estéril, discos de 5 mm de diámetro para usar como inóculo del patógeno en todas las pruebas.

Productos de control biológico

Se utilizaron productos de distintos orígenes: microorganismos (bacterias y hongos antagónicos), extractos de plantas y biorracionales (ácidos orgánicos y minerales); así como diferentes modos de acción (Tabla II).

Tabla II. Bioplaguicidas utilizados en el experimento.

Componente Activo/Microorganismo	Nombre Comercial	Modo de Acción
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Javelin®	Antimicrobiano
<i>Bacillus subtilis</i>	Serenade®	Antimicrobiano, inductor de defensas a la planta
<i>Streptomyces lydicus</i>	Acinovate®	Competición, antibiosis
<i>Streptomyces spp.</i>	Prot-1*	Competición
<i>Streptomyces spp.</i>	Prot-2*	
<i>Streptomyces spp.</i>	A 5030*	
<i>Streptomyces spp.</i>	383*	
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bioderma®	
<i>Trichoderma harzianum</i>	Th L-6®	
<i>Trichoderma harzianum</i>	Trianum®	
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Methazar®	
Compuesto de Microorganismos	BPG-Plus®	
Extracto de <i>Gobernadora</i> (<i>L. tridentata</i>)	Progranic Mega®	Fungistático
Extracto de <i>Cascalote</i> (<i>C. coriacea</i>)	Cascalote Amigo®	
Extracto de <i>Neem</i> (<i>A. indica</i>)	Trilogy®	Fungicida
Silicato de Potasio	Silikare®	Fungistático/Fungicida
Solución de Ácido Hipocloroso	Biozid Agrox®	
Peróxido de Hidrógeno + Plata	Sanosil®	

* Productos que aún no están disponibles comercialmente.

Adicionalmente se utilizó como testigo positivo Switch WG® (Ciprodinil + Fludioxonil / fungicida químico que inhibe el crecimiento del hongo) y como testigo negativo agua destilada estéril.

Enfrentamientos *in vitro*

Todos los enfrentamientos se realizaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo 20 ml de PDA en condiciones controladas (22±2°C, 12 horas luz). De cada tratamiento se tuvieron tres réplicas y todo el experimento fue repetido dos veces. Los bioplaguicidas se prepararon considerando las dosis recomendadas en campo (DRC).

- Metodología de enfrentamientos duales con hongos y bacterias antagonistas

Los productos a base de *T. harzianum* y *M. anisopliae* se sembraron en medio PDA, siguiendo la metodología de Pastrana (2014). Para ello se colocaron 40 µl de la solución diluida en la placa, los cuales fueron esparcidos con un asa de Drigalsky y posteriormente incubados por tres días bajo las condiciones antes descritas. Una vez que estos hongos desarrollaron micelio de manera uniforme por toda la placa, se tomaron, con auxilio de un sacabocados estéril, discos de 5 mm de diámetro, los cuales fueron colocados (uno en cada placa) frente al disco del patógeno, que había sido colocado 48 horas antes a 2.5 cm de la periferia de la placa. Las placas se incubaron a condiciones controladas de 20±2°C y 12 horas luz entre 3 y 7 días y posteriormente se determinó el porcentaje de inhibición radial del crecimiento (% IRC) de la colonia del patógeno mediante la fórmula de Royse y Ries (1978).

$$\text{Fórmula 1. \%IRC} = [(R1 - R2) / R1] \cdot 100$$

Donde R1 y R2 son el radio mayor y el radio menor desde el disco hasta el punto donde el patógeno se pone en contacto con el benéfico, respectivamente.

Para evaluar la actividad antagonista de los productos a base de *Bacillus spp.*, *S. lydicus* y el compuesto de microorganismos, se colocó en el centro de cada placa un disco de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno. Tras 48 h, cuatro gotas de 50 µl de la suspensión bacteriana de los productos se situaron equidistantemente en el borde de la placa. Posteriormente, las placas se incubaron durante 7 días, después de los cuales se determinó el % IRC, mediante la siguiente fórmula (Pastrana, 2014):

$$\text{Fórmula 2. \% IRC} = [(D1 - D2) / D1] \cdot 100$$

Donde D1 es el diámetro de la colonia del patógeno en la placa control (Blanco) y D2 el diámetro en las placas donde se enfrentó a las cepas bacterianas.

- Metodología *agar envenenado* para extractos y biorracionales

Las DRC de los agentes antifúngicos (Silicato de potasio, solución de Ácido hipocloroso y Peróxido de hidrógeno + plata) y los extractos vegetales (Gobernadora, Cascalote y Neem) se incorporaron y diluyeron en el agar (PDA) fundido a una temperatura de 55°C para después ser vertido en las placas y dejar solidificar. La siembra del disco conteniendo el patógeno se realizó en el centro de la placa. La determinación de la inhibición del crecimiento de la colonia se realizó mediante la fórmula de Pastrana (2014):

$$\text{Fórmula 3. Actividad Antifúngica (\%)} = [(D_c - D_s) / D_c] \cdot 100$$

Donde Dc es el diámetro de crecimiento de la placa control (Blanco) y Ds el diámetro de crecimiento en la placa que contenía el agente antifúngico probado.

- Metodología para productos a base de *Streptomyces* spp.

Para evaluar la efectividad de los productos a base de *Streptomyces* spp. (Prot-1 y Prot-2), no disponibles comercialmente porque se encuentran en fase de investigación, se siguió la metodología propuesta por la empresa desarrolladora de estos productos. Se tomó una relación de dilución 1/200 en base al medio de cultivo, por lo que en este caso se tomaron 125 µl del producto y se esparcieron con un asa de Drigalsky sobre la placa, se dejaron reposar hasta la absorción de éste por el medio (aproximadamente 1 hora). Posteriormente se colocó un disco conteniendo el patógeno. Las condiciones de incubación y la evaluación fueron similares a la metodología antes descrita.

Los productos A5030 y 383 se recibieron como siembras microbianas (cepas de *Streptomyces* spp. en placas con PDA), por lo que para obtener el inóculo, se sembraron cepas de estos productos en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio Agar Diferencial de Moho de Levadura (YMD) y se incubaron a 30°C por 4 días. Posteriormente se tomaron 200 µl del medio conteniendo el inóculo y se colocaron en una placa con medio PDA, distribuyéndose con auxilio de un asa de Drigalsky estéril. Las placas fueron incubadas con el tiempo y condiciones antes mencionadas. Posteriormente, se vertieron 4 ml de agua destilada estéril en la placa y con un asa de nicromo se resuspendieron las esporas. Con ayuda de una micropipeta se tomó la solución y se colocó en un tubo Eppendorf® estéril de donde se realizó el conteo de esporas con ayuda de una cámara de Neubauer, para ajustar la suspensión a una concentración de 10⁵ esporas /ml. Para el ensayo, se colocaron 100 µl de la suspensión de esporas de *B. cinerea* y se esparcieron por toda la placa con PDA. Seguidamente se situaron 4 gotas de 10 µl de la suspensión de esporas de los productos a evaluar en la parte periférica a la placa, se dejaron incubar durante 8 días a condiciones ya mencionadas y se evaluó el crecimiento micelial siguiendo la fórmula anterior.

Análisis de datos

Los datos obtenidos de la inhibición del crecimiento fúngico se realizó un análisis de varianza y cuando existieron diferencias significativas, se utilizó la separación medias (prueba HSD de Tukey) para determinar el valor del error estándar. Todos los cálculos se realizaron utilizando el paquete estadístico JMP (versión 13.0, SAS Institute Inc.) con $\alpha=0.05$ y un grado de correlación $r^2>0.80$ para una mejor reproducibilidad.

RESULTADOS

Inhibición de crecimiento general

La figura 1 muestra los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* considerando todos los aislados, para cada uno de los productos evaluados. De manera general Bioderma®, Trianium® (ambos a base de *T. harzianum*), Sanosil® (Peróxido de hidrógeno + plata) y Methazar® (*M. anisopliae*) presentaron porcentajes de inhibición superiores al 90%, sin diferencias estadísticas entre ellos ($\alpha\leq 0.05$). Los productos 383, A5030 (*Streptomyces* spp.), ThL-6® (*T. harzianum*), Progranic Mega® (Extracto de Gobernadora) y Silikare® (Silicato de potasio) ofrecieron efectividad moderada con porcentajes de inhibición entre 60 y 70%, y con un porcentaje de inhibición de 44%, estadísticamente inferior a los anteriores ($\alpha\leq 0.05$) resultó Serenade® (*B. subtilis*). El resto de los productos a base de *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, Extracto de Neem, algunas cepas de *Streptomyces* spp., Ácido hipocloroso, *S. lydicus*, Extracto de Cascalote y compuestos de otros microorganismos, resultaron ineficaces, con porcentajes de inhibición inferiores al 25%.

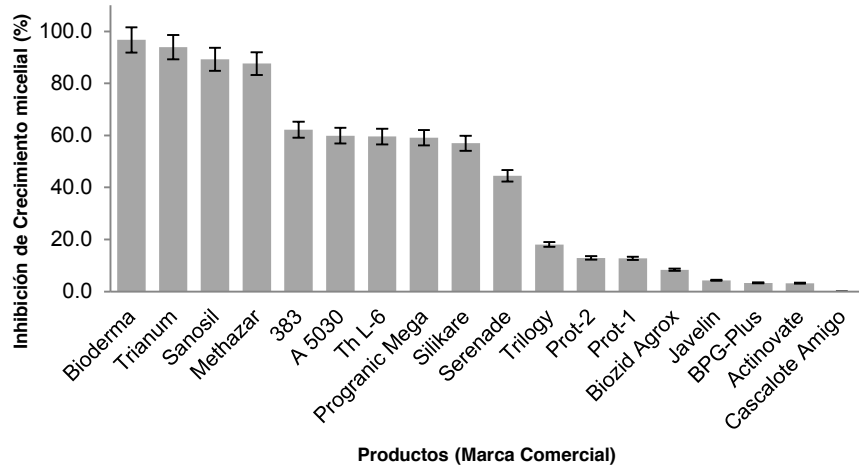


Figura 1. Efectividad de diferentes biofungicidas y productos biorracionales como inhibidores del crecimiento micelial de aislados de *B. cinerea* in vitro.

Inhibición de crecimiento por aislado

Al analizar los resultados obtenidos para cada aislado (fig. 2), se pudo observar que Bioderma® mostró una alta efectividad (casi 100%) para los aislados probados, a excepción del aislado proveniente de frambuesa (V108201JLRAS-1) (80%). Methazar® mostró un comportamiento similar a Bioderma®, pero en este caso el aislado BLJL-2 (proveniente de arándano) mostró resultados inferiores (~ 60%). Sanosil® mostró valores de inhibición similares estadísticamente ($\alpha \leq 0.05$) entre todos los aislados y por encima del 80%. Triatum® mostró resultados superiores al 90% a excepción del aislado de arándano (BLJL-1), que mostró un valor inferior al 80%. Resultados ligeramente similares entre los aislados mostraron los productos 383, A5030, Progranic Mega®, Serenade®, Silikare® y Th L-6®, con medias de aproximadamente el 60% de inhibición. Los restantes biofungicidas mostraron resultados más variables entre los aislados y con porcentajes de inhibición inferiores a un 25%.

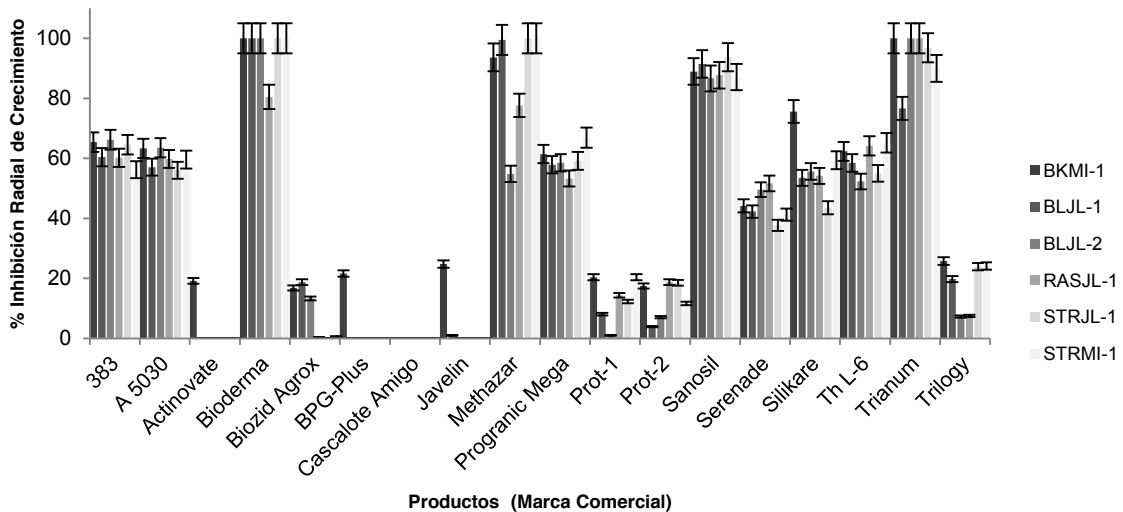


Figura 2. Efectividad de los biopesticidas probados en la inhibición del crecimiento de aislados de *B. cinerea*.

Inhibición de crecimiento según el cultivo origen de los aislados

La figura 3 muestra los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* para cada tratamiento, según el cultivo de donde se obtuvieron los aislados. Sanosil® presentó un porcentaje de inhibición estadísticamente similar para los aislados provenientes de los cuatro cultivos con valores entre 80 y 90%. Dos de los productos a base de *Streptomyces* spp. (383 y A5030) tuvieron comportamientos similares entre sí (~60%), y estadísticamente similar entre los aislados de los cuatro cultivos. Trianum® reflejó una inhibición alta para los aislados de los cuatro cultivos, aunque estadísticamente inferior para los aislados procedentes de arándano. Bioderma® mostró resultados cercanos al 100% de inhibición en los aislados provenientes de todos los cultivos, excepto el colectado de frambuesa (~80%). Methazar® presentó porcentajes de inhibición superiores al 90% para los aislados de zarzamora y fresa, e inferiores al 80% para los provenientes de arándano y frambuesa. Progranic Mega®, Th-L6®, Silikare® y Serenade® mostraron porcentajes de inhibición estadísticamente diferentes entre los aislamientos de los diferentes cultivos pero todos con valores entre 40 y 60%. Los restantes productos mostraron porcentajes de inhibición inferiores al 25%, y en el caso de algunos cultivos la inhibición fue nula.

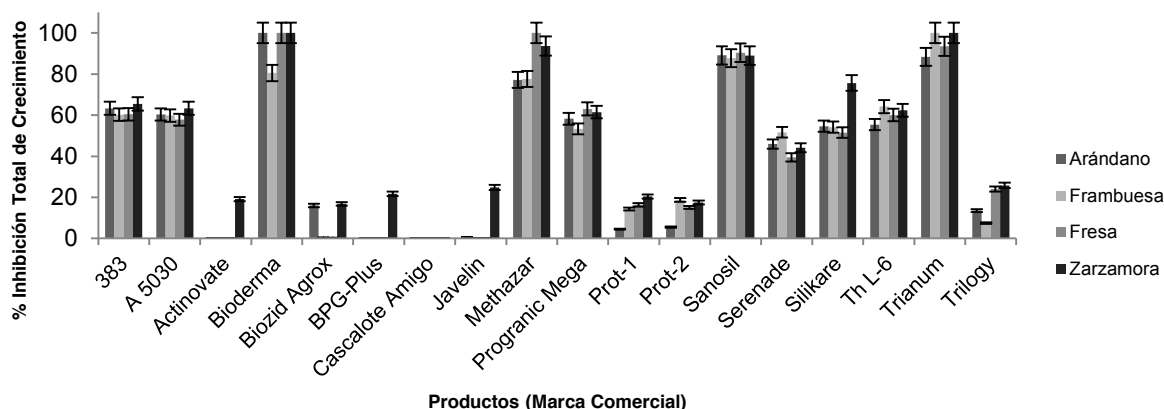


Figura 3. Efectividad de los biopesticidas en la inhibición del crecimiento de aislados de *B. cinerea* colectados en arándano, frambuesa, fresa y zarzamora.

Aunque en la actualidad no se tiene conocimiento de trabajos realizados de éste tipo, es necesario la confirmación de los datos arrojados en este estudio para ampliar el panorama de la patogenicidad de acuerdo al origen de los aislados. Para ello se debe realizar un estudio que abarque mayor número de aislados.

Inhibición de crecimiento por tipo de producto

En este caso se agruparon los productos en cinco categorías: bacterias (Javelin®, Serenade®, Actinovate®, Prot-1, Prot-2, A5030 y 383); biorracionales/ácidos orgánicos (Silikare®, Sanosil® y Biozid Agrox®); extractos vegetales (Progranic Mega®, Cascalote Amigo® y Trilogy®); hongos (Trianum®, TH-L6®, Bioderma® y Methazar®) y bacterias/hongos (BPG-Plus®). En la figura 4 se observa que los productos a base de hongos mostraron mejores resultados en cuanto al porcentaje de inhibición sobre los aislados utilizados en el experimento, con valores promedios superiores al 80%. Los biorracionales/ácidos orgánicos fueron los segundos en cuanto a eficacia del control del crecimiento micelial del patógeno, con porcentajes aproximados entre 50 y 60%. Los restantes grupos de productos ofrecieron inhibiciones inferiores al 40%.

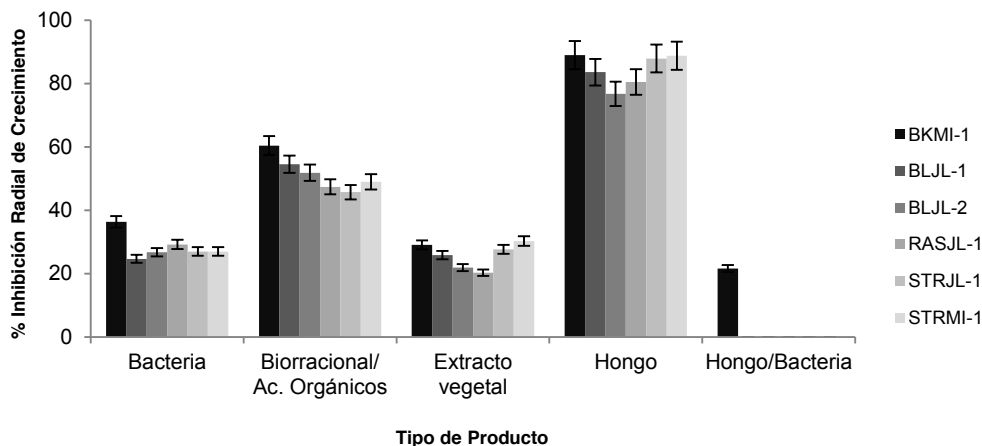


Figura 4. Eficacia de los biopesticidas agrupados por sus orígenes en relación con los aislados de *B. cinerea* utilizados en el experimento.

DISCUSIÓN

El hecho de que Sanosil® presentara los mejores resultados en cuanto eficacia y constancia entre los aislados se debe probablemente a que este producto tiene como componente principal la plata, que es conocida y utilizada como biocida y desinfectante, tanto de uso clínico e industrial como agrícola. En general se observaron diferencias en cuanto a la eficacia de algunos biopesticidas entre aislados y/u orígenes, lo que pudiera estar relacionado con las aplicaciones realizadas en cada una de las zonas de donde se colectaron las muestras. En este sentido la literatura refiere que es muy poco probable el desarrollo de resistencia de *B. cinerea* y otros hongos patógenos a productos biológicos (Elad *et al.*, 2004); no obstante, pudiera suceder que algunas cepas vayan desarrollando mecanismos de adaptación a los microorganismos benéficos comunes en su medio.

En el caso de extractos y productos biorracionales, pudiera existir mayor probabilidad de que algunos aislados desarrollen mecanismos de resistencia a los modos de acción y aunque este tipo de resistencia, en nuestro conocimiento, no ha sido documentado en la literatura, en este trabajo es notable para el caso de Silikare®, que inhibió el 70% del crecimiento micelial del aislado proveniente de zarzamora en la zona de Los Reyes, Michoacán (BKMI-1), no lo hizo de la misma manera para los restantes aislados. Un estudio que abarque mayor cantidad de aislados pudiera clarificar aspectos relacionados con estas hipótesis sobre interacciones microorganismo-microorganismo y microorganismos-extractos biorracionales.

Este trabajo ofrece herramientas preliminares que pudieran ser de utilidad para que los productores establezcan u optimicen programas de rotación de fungicidas orgánicos para un mayor control de las infecciones causadas por *Botrytis* spp., no obstante se recomienda que estos productos sean validados *in vivo* y en sistemas agrícolas. Debe considerarse además, que varios de estos componentes no se encuentran en las listas de productos autorizados para aplicación en varios de los cultivos de *berries*, por lo que deberían ser considerados por las personas competentes para su posible introducción.

CONCLUSIONES

- Bioderma®, Triatum®, Sanosil® y Methazar® demostraron ser los biopesticidas más efectivos para el control *in vitro* del crecimiento de *B. cinerea*, seguido de 383, A5030, Progranic Mega®, THL-6® y Silikare®, independientemente de el origen de los aislamientos.
- Serenade® logró inhibir el 44% del crecimiento del patógeno, mientras que los restantes productos a base de *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, Extracto de Neem, *Streptomyces* spp., Ácido hipocloroso, *S. lydicus* y Extracto de Cascalote fueron prácticamente incapaces de inhibirlo, con porcentajes inferiores al 25%.
- Sanosil® resultó ser el producto con mayor consistencia en cuanto a la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en todos los aislados, mientras que Bioderma®, Methazar® y

- Trianum® mostraron variabilidad entre los aislamientos del patógeno a pesar de su alta eficiencia en la inhibición de la mayoría de ellos.
- 383, A5030, Progranic Mega® y Th-L6® tuvieron porcentajes de inhibición similares entre todos los aislados, a pesar de que la eficacia fue inferior a los anteriores (~60%); mientras que los restantes productos mostraron resultados más variables entre los diferentes aislamientos del patógeno.
 - Con la excepción de 383, A5030 y Sanosil®, todos los productos mostraron resultados variables entre los aislados de diferentes cultivos, siendo estas diferencias menos marcadas (solo un aislado de un cultivo diferente) para Trianum®, ThL-6®, Silikare®, Progranic Mega® y Bioderma®.
 - En general los productos a base de hongos benéficos mostraron un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento de *B. cinerea*, seguido de los productos biorracionales y ácidos orgánicos. Los extractos vegetales y bacterias no fueron eficaces.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dubos, B., 1992. Biological control of Botrytis: state-of-the-art. In: Verhoeff K, Malathrakis NE, Williamson B (eds) Recent advances in Botrytis research. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, pp 267–271.
2. Elad, Y. y Stewart, A., 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynki, P., Delen, N. (Ed.), Botrytis: Biology, Pathology and Control (pp. 223-241). The Netherlands: Edit. Filinger.
3. Maas J.L., 1998. Compendium of strawberry diseases. The American Phytopathological Society. Minnesota, EUA. 98 p.
4. Nicot, P.C., Bardin, M., Alabouvette, C., 2011. Potential of biological control based on published research. 1. Protection against plant pathogens of selected crops. In: Nicot PC (ed) Classical and augmentative biological control against diseases and pests: critical status analysis and review of factors influencing their success. IOBC/WPRS, Zurich, pp 1–11.
5. Nicot, P.C., Bardin, M., 2012. Biological and integrated protection in the Mediterranean greenhouse: is disease management the weak link? IOBC WPRS Bull 80:11–17.
6. Nicot, P., Stewart, A., Bardin M. y Elad, Y., 2016. Biological Control and Biopesticide Suppression of Botrytis -Incited Diseases. In: Fillinger S. y Elad Y. (Ed.), Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems (pp. 165-187).
7. Pastrana, A., 2014. Evaluación de especies de *Trichoderma* y *Bacillus* como agentes de control biológico de dos enfermedades de fresa ocasionadas por hongos patógenos de suelo. Universidad de Sevilla, España. Royse, D. J. y Ries, S.M., 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. Phytopathology 68: 603-607.

ESTUDIO DE LAS HOJAS DE MORINGA OLEÍFERA POR LAS PROPIEDADES DE LA FIBRA Y SUS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Antonio Arreola-Martínez¹, Esther Ramírez-Moreno², Ernesto Alanís-García², Nelly Cruz-Cansino², Zuli Calderón-Ramos², José Arias-Rico² y Rosa María Baltazar-Tellez²

¹ Área Académica de Nutrición ² Área Académica de Enfermería,
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. antonioarreola@outlook.com

RESUMEN

La *Moringa Oleífera* es un árbol de la familia de las *Moringaceas*, donde su producción se ha extendido hasta Latinoamérica. En Hidalgo, específicamente en Tulancingo Hidalgo, es comercializada por proveedores regionales que la siembran y procesan de manera artesanal, y la encapsulan para su venta. La planta es conocida además por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y anti-nutricionales por la presencia de un alto contenido de proteínas.

Debido a que actualmente esta planta es comercializada ampliamente, de manera deshidratada y/o encapsulada. El consumo se lleva a cabo sin ninguna recomendación o regulación. Por lo tanto el objetivo del trabajo fué determinar la actividad antioxidante y las propiedades funcionales de la fibra dietética presente en las hojas de Moringa Oleífera obtenida de productores regionales.

El producto comercial de Moringa Oleífera fue obtenido de productores de Tulancingo Hidalgo. Las muestras fueron deshidratadas y homogeneizadas para determinar fibra dietética total y sus propiedades funcionales de la fibra: capacidad de retención de grasa, capacidad de retención de agua y capacidad de hinchamiento. Además se llevó a cabo la determinación de fenoles totales y la actividad antioxidante por las metodologías de ABTS y DPPH.

El producto comercial evaluado presentó un alto contenido de fibra dietética (3.4 g/100 g), la cual presentó buenas propiedades funcionales como retención de agua y grasa. Además presentó una buena cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

El producto deshidratado de hojas de Moringa Oleífera comercializado por productores de Tulancingo, Hidalgo, posee propiedades con importancia fisiológica gastrointestinal, por la cantidad de fibra dietética y sus propiedades funcionales así como por las propiedades estudiadas con un efecto antioxidante. Sin embargo, es importante conocer la cantidad recomendada de estos productos y la implicación en la salud cuando la población la consume sin ninguna recomendación establecida.

Palabras clave: xoconostle, fibra dietética total, actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

La *Moringa Oleífera* es un árbol que crece en zonas áridas, principalmente encontrado en medio oriente, originario de la India, Pakistán, Bangladesh y Afganistán, sin embargo, su uso se ha extendido mundialmente a África, Asia, el resto de medio oriente, es de la familia de las *Moringaceas*, donde su producción se ha extendido hasta Latinoamérica. Su producción principal en México se encuentra en la zona de Costa del Pacífico, abarcando desde Sonora hasta Chiapas incluyendo el sur de Baja California, ya que la zona idónea para su crecimiento es a 500-1500 metros/nm (Olson, 2011). En Hidalgo, específicamente en Tulancingo Hidalgo, es comercializada por proveedores regionales que la siembran y procesan de manera artesanal, y la encapsulan para su venta. Además de crecer en áreas semidesérticas y requiere muy pocos cuidados, por lo que su consumo se ha visto incrementado en zonas de escasos recursos. Este árbol se compone de raíz, tronco, tallo, hojas, vainas y flor, de las cuales todas pueden ser consumidas, sin embargo, las hojas son las que son consumidas más frecuentemente, se puede encontrar regularmente de forma fresca o seca debido a que las hojas pueden ser utilizadas como infusiones, condimentos, sazónadores o polvos (Bonafant, 2012). La planta es conocida además por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y anti-nutricionales por la presencia de un alto contenido de proteína, la cual se encuentra conformada de aminoácidos como leucina, lisina, valina, treonina e isoleucina (Sobhy, 2015), además aporta vitaminas como la A y C y minerales.

La hoja de *Moringa Oleífera* es conocida además por sus propiedades funcionales y nutricionales relacionadas con la disminución de inflamación glandular (Jaiswal, 2009), migrañas, regulación de glucosa en sangre (Mbikay 2012), y volumen sanguíneo debido al contenido de niacina y niacimicina,

desnutrición en el embarazo (Idohou-Dossou, 2011), desnutrición infantil, cansancio y anticancerígeno.

La *Moringa oleífera* es comercializada como suplemento alimenticio para tratar enfermedades no transmisibles, y es consumido de manera indiscriminada, por lo que existe el riesgo de desarrollar padecimientos o incrementar los efectos de las enfermedades no transmisibles. Estos productos no cuentan con una regulación por la COFEPRIS (Comisión federal para la protección de riesgos sanitarios) y actualmente es considerado como “producto milagro”.

Hasta el momento los estudios de la planta de *Moringa oleífera* es de plantas que se producen en otros países, en otro tipo de suelo, etc. La planta ha sido valorada por su composición (fibra dietética, algunos esteroides vegetales, así como algunos agentes antioxidantes de naturaleza polifenólica) han demostrado tener efectos positivos para el tratamiento de las enfermedades no transmisibles.

El estado de Hidalgo cuenta con cultivos comerciales de hoja de *Moringa oleífera* en el estado de Hidalgo, es primordial tener el conocimiento del contenido nutricional que este proporciona.

Debido a que actualmente esta planta es comercializada ampliamente, de manera deshidratada y/o encapsulada. El consumo se lleva a cabo sin ninguna recomendación o regulación. Por lo tanto, se planteó el siguiente objetivo general.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la fibra y las propiedades funcionales de la fibra dietética y las propiedades antioxidantes presente en las hojas de *Moringa Oleífera* obtenida de productores regionales del estado de Hidalgo.

METODOLOGÍA

Las hojas de *Moringa Oleífera* deshidratada fueron proporcionadas por un productor de la región de Tulancingo, San Bartolo Tutotepec en el estado de Hidalgo. Estas fueron mantenidas en congelación a -4°C hasta ser utilizada para su análisis.

Las muestras fueron deshidratadas y homogeneizadas para determinar fibra dietética total y sus propiedades funcionales de la fibra.

Fibra dietética (FDT)

La determinación de FDT consistió en la metodología enzimática gravimétrica de la AOAC. La determinación de fibra dietética total (FDT) consistió de tres etapas digestión enzimática filtración y corrección de valor de FDT con determinación de proteínas y ceniza. Se utilizaron métodos gravimétricos y enzimáticos empleando un kit comercial de ensayo de FDT (TDF-100A, Sigma).

Propiedades de la fibra

Capacidad de retención de agua (CRA)

La CRA se refiere a la cantidad de agua que el sistema de gel retiene después de haber sido aplicada una fuerza externa, generalmente la centrifugación. La CRA (mL/g) se determinará en base al peso del residuo de muestra que queda después de la centrifugación.

Capacidad de retención de lípidos (CRL)

La metodología utilizada para determinar la CRL se refiere a la de capacidad de absorción de moléculas orgánicas. La CRL (mL/g) se determinó considerando la cantidad de aceite retenido en la muestra durante un tiempo determinado y que posteriormente se llevó a cabo la centrifugación.

Propiedades antioxidantes

Compuestos fenólicos totales (CFT)

Para la determinación de CFT se realizó por el método Folin-Ciocalteu (Stintzing et al., 2005), el cual es un reactivo que mezcla los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica, esta reducción ocurre bajo condiciones alcalinas mediante la presencia de carbonato de sodio. La coloración azul es proporcional al contenido de compuestos fenólicos y esta respuesta es monitoreada a una longitud de onda de 765 nm. Para la determinación se utilizó ácido gálico como patrón de referencia en una curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por 100g de muestra en base seca (mg EAG/100 g bs).

Actividad antioxidante (ABTS)

La determinación de contenido antioxidante por ABTS se realizó de acuerdo con el método químico para determinar actividad antioxidante (Kuskoski, 2005). Se preparó una solución de ABTS al 7 mM/L con persulfato de potasio al 2.45 mM/L, se incubó durante 16 h en completa oscuridad a temperatura

ambiente, transcurrido el tiempo, se diluye en agua desionizada (proporción 1:15) hasta obtener una absorbancia de 0.7 (± 0.1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Se realizó una curva estándar, para esto se efectuaron concentraciones a partir de la solución de etanol con ácido ascórbico en concentraciones de: 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Se tomaron 20 μ L de cada concentración para la obtención de la curva de referencia dejando reposar por 7 minutos para finalmente determinar la absorbancia en un lector de microplacas (Power wave XS [Biotek]. Software KC Junior, USA). Los resultados se expresaron en Mg Equivalentes de Trolox por 100 g de muestra liofilizada (mg ET/100 g muestra).

Actividad antioxidante (DPPH)

La actividad antioxidante en base al radical DPPH se evaluó de acuerdo con el procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2011). El reactivo DPPH es un radical libre estable, que, en solución etanólica presenta una coloración violeta fuerte y su máxima absorbancia se obtiene una longitud de onda de 520 nm. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, como lo presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo debido al número de electrones apareados (Brand Williams et al., 1995). Para esta técnica, se mezclará con 100 mL de muestra y 500 μ L de solución de DPPH (7.4 mg de DPPH serán mezclados con 100 mL de etanol) en viales ámbar, se mezclarán (scientific, G560, USA) se dejará reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min (C1200/DW41, Labnet, Corea). La absorbancia se midió a 520 nm utilizando el lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Los resultados se expresaron como μ mol equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra en base húmeda (μ mol ET/ 100 g bh).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El producto comercial evaluado presentó un alto contenido de fibra dietética (22 g/100 g), la cual presentó buenas propiedades funcionales como retención de agua y grasa. Además presentó una buena cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Sin embargo, al considerarse un suplemento alimenticio, este no puede tratarse como un fármaco, ni puede ser recetado como tratamiento de ningún padecimiento.

La fibra dietética se clasifica en dos grandes grupos de acuerdo con su solubilidad: la fibra soluble (pectinas, gomas, mucílagos y algunas hemicelulosas) (Matos, 2010), estos compuestos se encuentran de manera soluble en el agua y ayudan a reducir los niveles sanguíneos de colesterol y de glucosa (Moreno et al, 2014). La fibra insoluble (celulosa, hemicelulosas, lignina), al no ser digeribles son capaces de absorber agua, aumentando el volumen de las heces y actuando como un laxante (Zambrano, 1988).

Este componente nutricional tiene importantes funciones regulando la mecánica digestiva, debido a sus propiedades de retención de agua, capacidad de hinchamiento, incremento de viscosidad, textura y formación de gel; por lo cual, también se adiciona a productos alimenticios como agente espesante para el reemplazo parcial del uso de harinas, grasas o azúcares, y como mejoradores de la retención lipídica o de agua. Sin embargo, un exceso de fibra puede resultar nutricionalmente inadecuado, ya que, por su acción laxante, hace que los nutrientes pasen más rápido por el tubo digestivo y pudiera reducir su absorción de estos, así como la retención de algunos minerales como calcio, hierro, zinc o magnesio, eliminándolos por las heces y pudiendo dar lugar, en casos extremos, a deficiencias de los mismos (Elleuch et al., 2011).

El contenido de fibra dietética en la *Moringa oleífera* analizada fue de 22 g/100 g bs. Este contenido se encuentra dentro de los valores establecidos en estudios de *Moringa* en los cuales refiere concentraciones de 25 a 30 g. En otros estudios se encontraron valores menores de 11 g/100 g bs, estableciendo que la variación en el contenido de fibra de las hojas de *Moringa oleífera* depende de diferentes factores como es la maduración y la altura del árbol. Hojas de árboles con gran altura presentaron un mayor contenido de fibra. El contenido de fibra en esta planta es alto, sobre todo si consideramos que su consumo es en estado deshidratado. En comparación con frutas y verduras de consumo convencional donde el contenido de fibra en general es entre 2 y 3 g/100 g de base fresca (bf), como es el caso del plátano (1 g), la naranja completa con bagazo (3.7 g), e jitomate (1.4 g) y la lechuga (2.8 g), inclusive muy por encima de las leguminosas (Frijol 7.5 g, haba cocida 4.8 g). La ingesta diaria recomendada (IDR) de fibra dietética es de 25 a 30 g, por lo que esta planta aportaría un 2 % (0.50 g de fibra/2 g muestra bs) de lo sugerido en la IDR. Un alimento puede

considerarse como fuente de fibra si contiene por lo menos 3 g de fibra por cada 100 g de muestra, además, si el producto al menos cuenta con 6 g de fibra por cada 100 g de muestra este entra en la categoría de un alimento alto en contenido de fibra, por lo que la planta de Moringa con valores de 22 g/100 g puede considerarse como una fuente rica en fibra. Debido a lo anterior, esta planta puede ser utilizada como un nutracéutico o un aditivo para enriquecer otros productos alimenticios.

La fibra además presentó la capacidad de formar geles y de retener líquidos y grasas. Estas propiedades son importantes desde el punto de vista tecnológico, ya que cuando estos alimentos con un alto contenido de fibra establece el comportamiento de la fibra con otros componentes de los alimentos como las proteínas, el agua y los lípidos. Por otro lado, también estas propiedades de la fibra, tiene que ver con la capacidad de formar geles y la retención de líquidos por el contenido de fibra dietética soluble e insoluble. Esto permite una menor digestión más lenta como los azúcares y las grasas. Y la retención de la humedad está relacionada con la hidratación de la fibra que pasa por todo el intestino grueso permitiendo tener heces más hidratadas y con mayor volumen evitando problemas de estreñimiento.

Los compuestos fenólicos que presenta la planta Moringa fueron de 8.71 mg EAG/100 g bs. Estos compuestos fenólicos aportaron actividad antioxidante a la planta de Moringa, encontrándose que la actividad antioxidante que presentó la planta fue de 8.24 m EAG/100 g bs medida como ABTS y de 4.01 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g bh}$ como DPPH. Estos valores son bajos si comparamos esta planta con frutos considerados antioxidantes como las berries. Según diversos autores (Dai et al.; Patras et al.) la zarzamora puede llegar a presentar hasta 534- 1694 mg/100 g db.

Finalmente la planta de Moringa tiene propiedades importantes por su alto contenido de fibra y compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos, es importante continuar con los estudios de esta planta con el objetivo de conocer otros beneficios relacionados, además de conocer su toxicidad para establecer recomendaciones de consumo.

CONCLUSIÓN

El producto deshidratado de hojas de *Moringa Oleífera* comercializado por productores de Tulancingo, Hidalgo, posee propiedades con importancia fisiológica gastrointestinal, por la cantidad de fibra dietética (22 g/100 g bs) y sus propiedades funcionales. La cantidad recomendada de 2 g/día de Moringa cubre el 2 % de las la Ingesta Diaria Recomendada de fibra. Sin embargo, es importante conocer la cantidad recomendada de estos productos y la implicación en la salud debido a que la población la consume sin ninguna recomendación establecida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonal Ruiz, Rolando, Rivera Odio, Regina Mercedes, & Bolívar Carrión, María Emilia. (2012). Moringa oleifera: una opción saludable para el bienestar. *MEDISAN*, 16(10), 1596-1599. Recuperado en 01 de mayo de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012001000014&lng=es&tlng=es.
2. Dai, J., Gupte A., Gates L., and Mumper R. J. (2009). "A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 4, pp. 837-847.
3. Idohou-Dossou N1, D. A. (2011). Impact of daily consumption of moringa oleifera (moringa oleifera) dry leaf powder on iron status of senegalese lactating women. *AJFAND*, 4985-4999.
4. Mohamed Elleuch, Dorothea Bedigian, Olivier Roiseux, Souhail Besbes, Christophe Blecker, Hamadi Attia. (2011), Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: 2 characterisation, technological functionality and commercial 3 applications: a review, *food chemistry*
5. Jaiswal, P. K. (2009). Effect of Moringa Oleifera Lam. leaves aqueous extract therapy. *Journal of Ethnopharmacology*, 392-396.
6. Mbikay, M. (2012). Therapeutic potential of Moringa Oleifera leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: review. *Frontiers in pharmacology*, 1-12.

7. Olson, M. E., & Fabey, J. W. (2011). Moringa Oleifera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de biodiversidad*, 1071-1082.
8. Patras A., Brunton, N.P., Da Pieve S., and Butler, (2009), "Impact of high pressure processing on total antioxidant and color of strawberry and blackberry purées", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 10. No. 3, pp. 308-313.
9. Sobhy A. El Sohaimy, G. M.-H. (2015). Biochemical and functional properties of Moringa Oleifera. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 188-199.
10. Florian C. Stintzing, Kirsten M. Herbach, Markus R. Mosshammer, Reinhold Carle, Weiguang Yi, Subramani Sellappan, Casimir C. Akoh, Ron Bunch, and, and Peter Felker (2005). Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005 53 (2), 442-451

EFFECTO DE LA EXTRACCIÓN CON ULTRASONIDO EN LA BIOACTIVIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE HUITLACOCHÉ (USTILAGO MAYDIS)

Leticia Xóchitl Lopez-Martínez¹, Ramiro Baeza Jiménez² y Guadalupe López García³

¹CONACyT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC, Culiacán, Sin. ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Delicias, Chih., ³Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, Toluca, Edo. de México.

RESUMEN

El huitlacoche son las agallas comestibles inducidas por *ustilago maydis* en las mazorcas de maíz, que se consume tradicionalmente en México y es considerado una alternativa alimenticia ya que es una fuente rica de ácidos grasos esenciales, proteínas y fitoquímicos que se han asociado con la capacidad de prevenir enfermedades degenerativas como la diabetes, enfermedad que se caracteriza por un estado de hiperglicemia y produce complicaciones relacionadas con el estrés oxidativo como camino común asociado a las patologías que se desarrollan en esta enfermedad. Un proceso de extracción debe maximizar la recuperación de compuestos con una degradación mínima, lo que resulta en un extracto con mayores bioactividades, utilizando tecnologías respetuosas con el medio ambiente y materias primas de bajo costo, como lo puede ser la extracción utilizando ultrasonido, el cual provoca rompimiento del tejido celular con el consecuente aumento del acceso del disolvente a los compuestos de interés y así mejorar la eficiencia de extracción. Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante e inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa de extractos acuosos obtenidos agitación y tratados con ultrasonido de huitlacoche. El contenido de compuestos fenólicos totales fue 222.19 y 661.45 mgEAG/100 g, la actividad antioxidante por DPPH[•] se encontró de 623.56 y 5151.37 mmoles TE/100 g y para ORAC 9672.31 y 33205.7 μ mol TE/100 g en extractos acuosos tratados por agitación y ultrasonido respectivamente. Los extractos acuosos tratados con ultrasonido inhibieron la actividad α -glucosidasa con mayor efectividad (72.3%) y α -amilasa (11.4%), mientras que los extractos metánolicos fueron menos efectivos. Las diferencias encontradas en las actividades estudiadas parecen depender de además del perfil único de compuestos fenólicos que poseen cada uno de los extractos, de la concentración de los mismos cuya extracción se vio potenciada por el tratamiento con ultrasonido.

INTRODUCCIÓN

Uno de los enfoques terapéuticos para disminuir la hiperglicemia postprandial es retardar la absorción de la glucosa a través de la inhibición de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos como α -glucosidasa y α -amilasa. Estudios epidemiológicos han demostrado que dietas ricas vegetales pueden reducir el riesgo de una amplia variedad de enfermedades incluyendo a la diabetes, debido a la presencia de compuestos de naturaleza fenólica.

En México, el huitlacoche se consume como un hongo comestible; en la actualidad es considerado una alternativa alimenticia, ya que en diferentes países es apreciado como una delicadeza culinaria comparada con las trufas y se le ha llamado caviar azteca debido a su sabor único. El huitlacoche son las agallas jóvenes que el hongo basidiomiceto *Ustilago maydis* induce en las mazorcas inmaduras de maíz (*Zea mays* L.). Este hongo es una buena fuente de proteínas, ácidos grasos esenciales, carbohidratos y compuestos de naturaleza fenólica (Paredes-López y col., 2013). A la fecha, los estudios dirigidos a la caracterización de fitoquímicos presentes en huitlacoche son escasos, por lo cual es importante profundizar en el conocimiento de la composición de este hongo, generando información que lo avale como un alimento funcional y nutracéutico.

De esta manera, se generará nueva información que contribuya a la promoción del consumo del huitlacoche así como su revaloración en la dieta de la población de todo el país.

En la búsqueda de métodos de extracción más amigables con el medio ambiente, disminuir el consumo de solvente, acortar el tiempo de extracción, y aumentar el rendimiento de extracción, se han desarrollado técnicas para la extracción de nutracéuticos incluida la extracción asistida por ultrasonido, que es una alternativa económica, simple y eficiente a las técnicas de extracción por agitación. La mejora en la extracción obtenida mediante el uso de ultrasonido se atribuye principalmente a los efectos de las cavitaciones acústicas producidas en el solvente por el paso de una onda ultrasónica. El ultrasonido también ejerce un efecto mecánico, lo que permite una mayor

penetración del disolvente en la matriz de la muestra, lo que aumenta el área de la superficie de contacto entre la fase sólida y la líquida. (Wang y otros, 2008).

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Se colectaron muestras de huitlacoche de mercados municipales del Estado de Sinaloa, en los meses de febrero y marzo de 2017. Las muestras se limpiaron, liofilizaron y molieron hasta lograr un polvo fino y se almacenaron en la oscuridad a 4°C hasta el momento de ser utilizadas.

Obtención de los extractos crudos

La extracción acuosa se realizó pesando 4 g de muestra en un tubo de 40 mL y se adicionaron 25 mL de agua destilada y se agitaron durante 12 h con agitación constante, después de ese tiempo las muestras fueron filtradas con papel filtro Whatman No. 2, y los filtrados se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min, se retiraron los sobrenadantes y fueron almacenados a 4°C hasta el momento de ser analizados. Para la obtención por ultrasonido se pesaron 4 g de muestra en un tubo de 40 mL y se adicionaron 25 mL de agua destilada y se colocaron en un sonicador Bransonic 1510R-MTH (Danbury, EE.UU.), y sonicados a 42 kHz durante 30 minutos a 20 ° C posterior a esto se trataron como los extractos convencionales.

Determinación de compuestos fenólicos totales

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó por el método de Gao y col. (2002). En un tubo de ensayo se colocaron 100 μ L de los extractos y se les adicionaron 700 μ L de una solución 0.2N del reactivo de Folín-Ciocalteu, se mezclaron y reposaron durante 3 min a 25 °C, posteriormente se adicionaron 900 μ L de carbonato de sodio y la mezcla se mantuvo por 90 min en la oscuridad, después de ese tiempo se determinó la absorbancia a 765 nm. Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como equivalentes de ácido gálico/100 g (EGA/100 g) en base a una curva estándar. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett Packard HP8452A.

Actividad antioxidante

Capacidad Antioxidante por DPPH- (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

La capacidad para inhibir la acción del radical DPPH- de los extractos fue determinada por el método de Huang y col. (2005). 20 μ L de los extractos y 280 μ L DPPH (200 μ M) fueron colocados en una placa de 96 pozos (Costar™, EEUU), después de 30 min (25 °C) de incubación la absorbancia fue medida a 540 nm en un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek™, Inc, EEUU) y se utilizó metanol al 80% como blanco. La actividad antioxidante se expresó como mm equivalentes de trolox por 100g (mMET/100 g)

Capacidad Antioxidante (Método ORAC)

La capacidad de los extractos para absorber especies reactivas de oxígeno fue determinada por el método de Huang y col. (2002). A partir de los extractos se realizaron diluciones (10:1990 μ L, v/v) con amortiguador de fosfatos 75 mM (pH 7.4). Alícuotas de 25 μ L de la muestra, amortiguador de fosfatos como blanco 25 μ L y 25 μ L de una curva estándar de trolox 400 μ M fueron colocadas en una microplaca de paredes oscuras y fondo claro. El lector de fue programado para dispensar 200 μ L de fluoresceína 0.96 μ M y 75 μ L del radical libre 2,2'-azobis,2-amidino-propano dihidrocloro (AAPH) 95.8 μ M, iniciando la reacción una vez adicionado este último reactivo, midiendo la fluorescencia por 70 min con intervalos de 70 seg a una longitud de onda para excitación de 485 nm y para emisión de 580 nm. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por 100 g (μ MET/100g).

Actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa

El ensayo para medir la inhibición de la actividad de la α -amilasa por los extractos fue adaptado de Adisakwattana y col. (2009). La enzima α -amilasa (páncreas de porcino, 3 U/mL) fue disuelta en amortiguador de fosfatos salino 0.1 M pH 6.9. Se adicionaron 200 μ L de los extractos en una solución de almidón (1 g/L) y la reacción se inició al adicionar 500 μ L de la solución de la enzima, la mezcla fue incubada a 25°C durante 10min, después de ese tiempo se adicionaron 500 μ L de amortiguador de fosfatos 0.02 M (pH 6.9 con cloruro de sodio 6 mM). La mezcla de reacción se incubó nuevamente a 25°C durante 10 min y se detuvo por la adición de 1 mL de una solución que contenía ácido dinitrosalicílico al 1%, fenol al 0.2%, Na₂SO₃ al 0.05% e NaOH al 1% en solución acuosa. Después de ese tiempo, la mezcla se incubó a 90°C durante 5 min, y se enfrió a 25°C. Posteriormente, la

mezcla se diluyó con 10 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia a 540 nm. La muestra control consistió en 200 μ L de amortiguador de fosfatos pH 6.9, en lugar de los extractos. Se utilizó una solución de 0.44 mg/mL de acarbosa como inhibidor positivo.

Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

El ensayo para medir la inhibición de la actividad α -glucosidasa de los extractos fue adaptado de Yuan y col. (2012). Una mezcla de 50 μ L de los extractos (0.7 mg/mL de compuestos fenólicos totales), 100 μ L de amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 6.9 y 100 μ L de una solución de α -glucosidasa de levadura *S. cerevisiae* (67 mU/ensayo) se incubaron en un plato de 96 pozos a 25°C durante 10 min, después de ese tiempo, se adicionaron 100 μ L de una solución de p-nitrofenil α -D glucopiranosido (p-NPG) 0.1 M en amortiguador de fosfatos pH 6.9 a cada pozo. Esta mezcla fue nuevamente incubada a 25°C durante 10 min. La absorbancia fue determinada a 405 nm en un lector de microplatos (SpectraMax M2, Molecular Devices Corp., SoftmaxPro v.4.6 software, Sunnyvale, CA, USA). Los cambios en la absorbancia fueron determinados antes de la incubación y después de 30 min de la adición del p-NPG; y fueron comparados con una muestra control que consistió en 50 μ L de amortiguador de fosfatos pH 6.9, en lugar de los extractos. Se utilizó una solución de acarbosa (0.44 mg/mL) como inhibidor positivo.

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron diseñados utilizando un diseño de bloques completamente al azar y el nivel de significancia ($p < 0.05$) entre medias de los tratamientos se estableció utilizando ANOVA de una sola vía con el software MINITAB v.15.

RESULTADOS

Los compuestos fenólicos han recibido creciente atención debido a sus actividades biológicas. López-Martínez y col., (2013), han reportado que este tipo de compuestos juegan un papel importante en la actividad α -glucosidasa y α -amilasa, por lo tanto, pueden contribuir al manejo de la diabetes tipo 2, en este estudio los compuestos fenólicos constituyen el principal grupo de compuestos que actúan como antioxidantes.

El contenido de compuestos fenólicos totales, la capacidad antioxidante y la actividad inhibitoria de los extractos de huitlacoche se muestran en la Tabla I. El contenido de compuestos fenólicos totales varió de 222.19 a 661.45 GAE/100 g, la capacidad la capacidad antiradical por el método de DPPH se encontró de entre 515.132 a 623.56 mM TE/100 g y para el método de ORAC de 9672.31 a 33205.7 μ M TE/100 g para los extractos acuosos obtenidos por agitación y ultrasonido respectivamente.

Tabla 1. Compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa de extractos acuosos de huitlacoche

Tipo de extracción	CFT mgEAG/100 g	DPPH mM TE/100 g	ORAC μ M TE/100 g	α -amilasa (%)	α -glucosidasa (%)
Agitación	222.19 ^a	515.13 ^a	9672.31 ^a	10.44 ^a	52.89 ^a
Ultrasonido	661.45 ^b	623.56 ^b	33205.7 ^b	14.42 ^a	72.33 ^b

Ambos tipos de extractos exhibieron capacidad de inhibir la actividad de la enzima α -amilasa a la concentración probada de 2 mg/mL. El porcentaje más elevado se observó en los extractos acuosos por ultrasonido (14.4.2%) sin embargo no existe diferencia significativa con los extractos obtenidos por agitación (10.44%). respectivamente (Tabla 1), también estos extractos fueron capaces de inhibir a la enzima α -glucosidasa (52.89 y 72.33%) para los extractos obtenidos por agitación y ultrasonido respectivamente, estos extractos fueron cercanos a la actividad presentada por la droga terapéutica acarbosa (87% de inhibición).

En general la actividad inhibitoria de los extractos metanólicos es mayor que la de los extractos acuosos probablemente debido al tipo de compuestos fenólicos que se encuentran presentes en cada uno de ellos. Las diferencias en compuestos fenólicos y actividad antioxidante encontradas en este estudio con respecto a estudios previos pudieran ser debidas a la diferencia entre las variedades

estudiadas, a su origen, incluyendo los factores climáticos, además del tipo de extracción y concentración de compuestos fenólicos a los que cada uno fue evaluado.

CONCLUSIONES

El huitlacoche contiene compuestos de naturaleza fenólica con características antioxidantes interesantes dependientes del método de extracción.

En general, diferencias significativas ($P > 0.05$) se observaron en el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante dentro del método de extracción (agitación o ultrasonido). Sin embargo, la alta actividad inhibitoria de α -amilasa no se vio afectada por el método de extracción. La fuerte inhibición de α -glucosidasa y la menor inhibición de α -amilasa indican que el huitlacoche podría representar una opción para la reducción de glucosa postprandial en sangre con efectos secundarios adversos mínimos.

BIBLIOGRAFÍA

1. O. P. Paredes-López, F. G. Lara, L. A. Bello-Pérez. *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. Fondo de cultura económica, Vol. 212, 4, 2013, pp. 289.
2. L. Gao, B. D. Oomah, G. Mazza, G. (2002). *Wheat quality: antioxidant activity wheat millstreams*. In P. Ng, & C. W. Wrigley (Eds.), *Wheat quality elucidation*. St. Paul, MN: AACC International, ACCC Press. pp. 233.
3. D. Huang, b. Ou, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan y R.L. Prior. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444 (2002).
4. S. Adisakwattana, P. Chantarasinlapin, H. Thammarat, S. Yibchok-Anun, S. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal alpha-glucosidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 24 (5), 1194–1200
5. Yuan, T., Wan, C., Liu, K. and Seeram, N.P. 2012. New maplexins FI and phenolic glycosides from red maple (*Acer rubrum*) bark. *Tetrahedron*. 68 (4), 959–964. (2009):
6. L.X. López-Martínez, L. M., Aguilar Cisneros, O. Dublán-García. Actividad antioxidante e inhibitoria de α -glucosidasa y α -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.). *Nova scientia*, 2014, 6(12), 234-347.

ELABORACIÓN Y FORMULACIÓN DE UN BIO-INSECTICIDA A BASE DE EXTRACTOS DE CHICALOTE (*ARGEMONE MEXICANA*) PARA EL CONTROL DE PLAGAS

Adriana Jiménez Caballero¹, Miguel Ángel Miranda Cerritos² y Guadalupe García Rodríguez¹

¹ Instituto Tecnológico de Roque, Extensión Apaseo el Alto, Gto., ²Cantabria Research Laboratorios. jimenez0315@hotmail.com, miguelm@equinoxagro.com

INTRODUCCIÓN

El *Argemone mexicana* L. pertenece a la familia de las Papaveráceas. Otros nombres populares: Cardo amarillo, adormidera amarilla (Paraguay), cardo blanco (Chile), chicalote (México), prickly poppy, mexican poppy (U.S.A.). Es una planta nativa de sur de U.S.A., México, América Central, Colombia, Guyana, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Uruguay y Argentina. Naturalizada en La India, Java, Egipto, Ghana, Nigeria, Australia. Cultivada en U.S.A. y Europa, por sus flores vistosas. El género *Argemone* comprende diez especies, todas ricas en alcaloides derivados de la isoquinoleína (berberiana y protopina). Las semillas de esta planta rinden una gran cantidad de un aceite fijo de color amarillo de olor nauseabundo. Este aceite forma un jabón duro con hidróxido de sodio, y en la saponificación se forman ácidos acético, butírico y valeriano con trazas de benzoico (Frölich, 1871). Este aceite es catártico en dosis bajas con una densidad de 0.919 a 16.5°C (Flückinger) de capsulas y hojas se ha aislado en pequeñas cantidades de morfina que fue obtenida por Charbonnier en 1868. También se cree que posee sanguinaria.

Con la implementación de un insecticida a base de extractos naturales se espera reducir la contaminación del medio ambiente a base de químicos con residualidad de altas concentraciones, contaminación de suelos, mantos acuíferos e intoxicación tanto de personas como de animales domésticos. Además con el ingrediente activo que es de origen vegetal será poco nocivo para las personas pero en cantidades adecuadas será letal para las poblaciones de insectos.

Argemone mexicana L. (papaveraceae) con sinónimos populares: Cardo, cardo santo, cardo lechero, cardos nato, cardo reina, Carmen santo, chacalota, chicalota, chicalota blanco, chocolae, espina blanca, fachina; estado de México: ostrené, ost-biyishi-villi(mzahua); Guerrero: chicali, tlapa; Michoacán: Xate (puruhepecha); Morelos: ayohuixtle, chigalotl (náhuatl); Nayarit: chicalote sha, zamuitiza (cora), jo-he (tepehuán del Sur); Oaxaca; San pedro agats; quintano Roo: h-man, ixhánlo(maya); Yucatán: ix'kán lool, jan, x-carbesanto; San Luis Potosi:tsolich (tenek).

Es una maleza que crece anualmente. Tienen las hojas de color verde azulado con líneas azul-brillante y se ven desgarradas, con el borde dentado, terminando cada diente en una espina. Las flores son amarillentas, grandes y parecen como si fueran de papel. Tiene los frutos como unas cápsulas alargadas y espinosas, por la parte superior se abren y al madurar, se escapan las semillas, las cuales son muy pequeñas, negras y rugosas.

La planta se caracteriza por la presencia de alcaloides iso-quinolinicos detectados en todos sus órganos. La protopina y la berberina se encuentran en mayor cantidad en las ramas, y la sanguinaria en la raíz y en las semillas. Alcaloides menores incluyen la Cheilantiofolina, cheileritina, coptisina, criptosina, eculerina y estilopina. En las flores se detectaron los flavonoides 3-metoxi-queracetín, iso ramnetín y el mono y diglucósido. En la semilla, el argemexitín, eriodictiol y luteolín; un aceite fijo en el que se encuentran los ácidos grasos argemónico y mexicanol, y mexicanol. La raíz contiene beta-sitosterol.

Báez (2010) evaluó extractos de 7 plantas contra larvas de cuarto instar de *Aedes aegypti*, entre esas plantas se encontraba *Argemone mexicana*. Extractos de la planta fueron tóxicos para las larvas obteniéndose valores de CI50 menores a 100 mg/L. además a través de pruebas colorimétricas se encontró la presencia de alcaloides, lo que indica que estos compuestos pueden ser los responsables de la actividad en contra de las larvas.

Un insecticida o plaguicida es un producto fitosanitario utilizado para controlar insectos generalmente por la inhibición de enzimas. El origen etimológico de la palabra insecticida deriva del latín y significa literalmente "matar insectos".

Para 2001 se estimaba que existían 900 productos insecticidas y 600 ingredientes insecticidas activos en el mercado. Millones de toneladas de pesticidas son aplicadas anualmente; sin embargo,

se estima que menos del %% de estos productos alcanzan el organismo blanco, que el resto es depositado en el suelo así como en la atmosfera y el agua (Badui, et al., 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente trabajo se realizó en el Instituto Tecnológico de Roque, el cual se encuentra ubicado dentro de las coordenadas 20°34'53.11" Latitud Norte y 100° 49' 33'26" Longitud oeste, a una altura de 1768 msnm. Para el desarrollo experimental se tomó como material biológico dos etapas, inicial y vegetativa del cual se obtiene material de la parte de raíz y hoja.

El proceso de separación del ingrediente activo se hizo por partes y se dividió en hojas y raíz, posteriormente se pasó a un proceso de trituración mecánica en un NutriBullet®, se realizó por separado moliendo toda la parte de hojas y después la raíz, posteriormente se le agregaron dos tipos de solventes y se almacenaron los frascos serrados en un lugar fresco y seco, esto para evitar que entren en contacto con la luz durante el proceso de extracción de la sustancia activa, se hicieron tres repeticiones de cada una de ellas se dejaron reposar 24, 48 y 72 horas respectivamente para posteriormente filtrar el solvente. Para este proceso se utilizaron vasos de precipitado, papel filtro y balanza Ohaus con sensibilidad de 0.01.

Para la elaboración de un polvo humectable (WP) se obtuvieron 200ml de la solución anterior, se incluyó un vehículo y/o secante un humectante y un dispersante, se procedió a pesar en un vaso de precipitado 180.57gr de vehículo y/o secante adicionándole 8gr de humectante y 8gr de dispersante, una vez adicionados y pesados se comenzó a mezclar de forma envolvente a baja velocidad en una batidora con aspas. Posteriormente en un vaso de precipitado se pesó 29.5gr de la solución líquida con el solvente una vez incorporados todos los ingredientes en la batidora se dejó mezclando por 15 minutos más para después pasarlo a una bandeja extenderlo y meter a horno de secado.

Prueba de humectación.

Una vez seco el polvo se procedió a tamizarlo en malla número 100 con abertura de 0059 pulgadas, en una probeta de 1000ml se agregó 10gr de producto tamizado y seco, contabilizando el tiempo de humectación del producto.

Contenido de humedad.

Se procedió a tomar el contenido de humedad a la muestra en un determinador de humedad marca Ohaus, agregando 5gr de producto en un tiempo determinado de 2.8 minutos.

Tamaño de partícula.

Se determinó el tamaño de partícula del polvo con un medidor CILAS para saber el número de micras representativo en la muestra.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Para el proceso de extracción del ingrediente activo el mejor solvente fue el alcohol, en tiempo de humectación todas las repeticiones se asemejaron en los minutos de 0.50 segundos - 0.52 segundos, en el caso del porcentaje de humedad todas las muestras obtuvieron un 0.90% de humedad, en cuanto a tamaño de partículas el diámetro medio fue de 9.87 micras.

Cuadro 1: soluciones de material vegetativo.

Solución	Peso MV (gr)
Hoja EI	26.84
Hoja EV	80.89
Hoja/ EI/ solvente 3	13.51
Hoja/ EV/ solvente 3	41.26
Hoja/ EI/ solvente 2	13.33
Hoja/ EV/ solvente 2	39.63
Raíz/ EI/ solvente 3	1.77
Raíz/ EV/ solvente 2	6.02

MV- Material vegetativo

EI- Etapa inicial

EV- Etapa vegetativa

ER- Etapa reproductiva

AR- *Argemone mexicana*

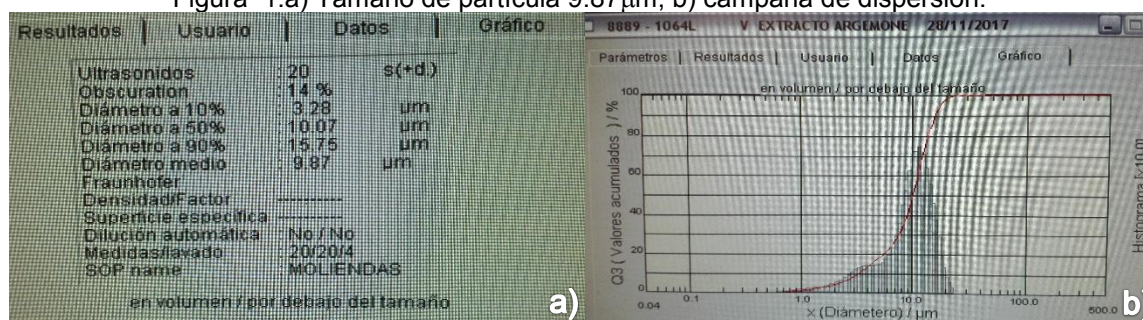
*El peso fue tomado después de la trituration.

Cuadro 2: resultados prueba de humectación.

Producto WP	W(gr) producto	Agua (ml)	Tiempo de humectación (min)
EI	10.01	1000	00:50
EV	10.03	1000	00:52
ER	10.05	1000	1:14

Cuadro 3: contenido de humedad de 3 muestras.

Producto WP	W(gr) producto	Tiempo de determinador	% de humedad
EI	5.020	2.8 min	0.90
EV	4.962	2.6 min	0.90
ER	4.985	2.8 min	0.90

Figura 1:a) Tamaño de partícula 9.87 μm , b) campana de dispersión.

Los resultados en campo quedan pendientes debido a escasos de material para elaborar una cantidad bastante considerable.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS VIRTUALES.

1. Argueta-Castro, C. 2003. Evaluación preliminar de la actividad plaguicida de cinco extractos botánicos para combatir al pulgón (*Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe) del loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson). Universidad de el Salvador, El Salvador.
2. Munro, D. 2014. Plantas con propiedades insecticidas. Colima, México. 14 p.

3. Cultivo de cardo santo (*Argemone mexicana*) usos, herbotecnia (en línea). Disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-argemone.html>
4. Definición de insecticida. Noviembre, 2017 (en línea). Disponible en: <http://www.lahistoriaconmapas.com/historia/historia2/definicion-de-insecticida/>
5. Silva-Laguna, Rodríguez-Rodríguez. Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. Costa Rica. 2016.
6. Ponce, Cantu, Flores, Badii, Zapata, Lopez, Fernandez, C. Modo de acción de los insecticidas. Octubre-Diciembre, 2006. Monterrey, N.L., México.
7. Mendoza, F. Evaluación biocida de extractos de las semillas de las plantas *Argemone mexicana* y *Argemone platyceras*, contra el vector transmisor del dengue: *Aedes aegypti*. Julio, 2013. México, D.F.
8. Divine, Eza, Ogusucu, Furlong. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Perú. Marzo, 2008 (en línea). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342008000100011&script=sci_arttext
9. Y.-C. Chang et al. Cytotoxic Benzophenanthridine and Benzylisoquinoline Alkaloids from *Argemone mexicana*. Febrero, 2003. Taiwan.
10. I. Bhattacharjee et al. Isolation and identification of antibacterial components in seed extracts of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). Julio, 2010. Bengal, India. C. Alagesaboopathi*, Kalaiselvi. Antimicrobial activities of the root, stem and leaf extracts of *Argemone mexicana* L. Mayo, 2012. Tamil Nadu, India.
11. C Lekhya, Venkata*. Ethnobotanical and current ethnopharmacological aspects of *Argemone mexicana* linn: an overview. 2015. Tamil Nadu, India
12. G. K. Dash and P. N. Murthy. Evaluation of *Argemone mexicana* Linn. Leaves for wound healing activity. 2011. Odisha, India.
13. K Ansari, Dhawan, Khanna, Das *. In vivo DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice. Septiembre, 2004. India.
14. MN Abubacker, Ramanathan. Antibacterial Activities of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) Leaf Extract on Pathogenic Bacterial Strains. Julio, 2012. Tamil Nadu, India.
15. K. M. Ansari et al. Unequivocal evidence of genotoxic potential of argemone oil in mice. Agosto, 2004. New Delhi, India.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS INTRACELULARES EN *T. ASPERELLUM* H15 DURANTE UN PROCESO DE BIOGRADACIÓN CON PIRENO.

Nuvia Sosa Díaz, Diana Verónica Cortés Espinosa

Instituto Politécnico Nacional, Centro De Investigación En Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN); Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México

RESUMEN

Los hongos filamentosos tienen una fuerte pared celular lo que hace que el proceso de disrupción celular sea desafiante y a menudo uno de los pasos más difíciles para su preparación en 1-D y su subsecuente estudio proteómico. Debido a esto, el objetivo de este estudio fue establecer un protocolo para *T. asperellum* H15 y extraer las proteínas intracelulares en un proceso de biodegradación con pireno en una fermentación en estado sólido usando como soporte inerte espuma de poliuretano (EPU). Para ello, se compararon tres métodos para su posterior cuantificación y análisis por electroforesis. De las diferentes metodologías en nuestro ensayo, el mejor método fue el tratamiento con TCA/Acetona-Fenol/metanol, propuesto por Fernández-Gonzales y Novo 2013.

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos ascomicetos como *Trichoderma* pueden ser considerados como un modelo de organismo ya que poseen la habilidad para producir enzimas capaces de degradar numerosos xenobióticos entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) los cuales son 18 de estos son considerados por la agencia Ambiental de los Estados Unidos (EPA) teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos [1] [8]. Por ello el empleo de organismos, es una herramienta cada vez más utilizada para biorremediar sitios contaminados con HAPs, debido a sus bajos costos.

Por ello es importante conocer los cambios que se producen y como se regulan las proteínas intra y extracelulares durante un proceso de biorremediación, debido a ello es necesario un método eficaz para la extracción de proteínas y a menudo representa uno de los pasos más difíciles para su preparación en 1-D [3]. Debido a que los hongos filamentosos poseen una excepcional pared celular fuerte y gruesa, eso hace que el proceso de disrupción celular sea desafiante. Además, de secretar proteasas, que pueden influir en los procedimientos de extracción causando degradación proteica [1][6] [3].

El principal objetivo de este estudio fue establecer un protocolo para *T. asperellum* H15 y su análisis en 1-DE, en presencia de pireno, por ello se eligieron tres métodos basándonos en los diferentes métodos para precipitar las proteínas y minimizar la pérdida cuantitativa de estas. Otro objetivo establecido fue evaluar la capacidad de esta cepa a tolerar y degradar hidrocarburos, que puede ser usada en un organismo potencial para la biorremediación.

PARTE EXPERIMENTAL

T. asperellum H15 fue obtenida del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, esta cepa fue aislada de un suelo contaminado con crudo Maya [8].

Condiciones de crecimiento: *T. asperellum* H15 se mantuvo en placas de agar papa dextrosa (PDA) a 30°C. La producción de esporas se llevó en matraces de 250mL que contenían 20mL de PDA, inoculados con la cepa H15 e incubados a 30°C. La colecta de esporas se llevó al día 4 con la adición de 20mL de solución Tween 80 al 0.1%.

Tratamiento del soporte inerte: Se utilizó como soporte EPU que había sido cortada en cuadro de 1x1cm y se colocó 1.5g en viales de 600mL, que posteriormente fueron contaminados con 1000mg Kg⁻¹ de pireno, con los respectivos controles y secados a temperatura ambiente. Posterior, cada botella fue inoculada con 1x10⁷ esporas/gr de soporte, adicionando 15mL de medio Czapek (g L⁻¹: sacarosa, 15; nitrato de sodio, 4; sulfato de potasio, 2; sulfato de magnesio, 1; sulfato ferroso, 0.02, cloruro de potasio, 1; pH 6.0) e incubados por 5 días a 30°C.

1. Extracción de las proteínas

1.1 TCA/Acetona- fenol/metanol

Las muestras de EPU fueron suavemente lavadas con PBS para eliminar restos celulares extracelulares, posterior a ello se colocó en tubos falcón, para llevarse a cabo la disrupción celular, utilizando el método propuesto por (González-Fernández y Jorin, 2013) que se basa en la adición

de TCA/ acetona que ayudan a permeabilizar la membrana, con ayuda de un tampón de lisis SDS-Fenol promueven la ruptura de la pared celular liberando el contenido celular, seguido de la precipitación de proteínas con metanol/acetato de amonio.

1.2 Ruptura lisis vía ebullición con solución alcalina

El segundo método que se utilizó fue propuesto por (Chourey et al., 2010) este se basa en la solubilización de la pared con un tampón de lisis alcalina SDS con modificaciones, a baño maría durante el proceso se inactivan proteasa y promueve la liberación del contenido intracelular, con la posterior precipitación con TCA / acetona al 100%. Para conocer el mejor tiempo, la extracción de las proteínas las muestras fueron calentadas por 10 y 20 minutos respectivamente.

1.3 Ruptura mecánica sonicación

El tercer método se basa en un tampón de extracción ideado por Kim et al (2014) con modificaciones Mg/Tritón X, para extraer las proteínas con un sonicador. (Omni Sonic Ruptor 4000. La precipitación de las proteínas se realizó solo con acetona. El tiempo de sonicación se varió por un periodo de 20 y 30 minutos.

Electroforesis 1-D

La electroforesis 1-D: SDS PAGE fue realizada en geles pre-hechos (Mini-Protean TGX Precast Gels 12% de poliacrilamida Bio-Rad), se realizó de acuerdo con el procedimiento suministrado con el set de electroforesis. Posterior a ello, las muestras fueron mezcladas con buffer Lammeli en una relación 1:1 (v/v) e incubadas por 5 minutos a 90° C en un termobloque, 20µl de cada muestra fueron adicionadas al gel con buffer SDS. El corrimiento de la electroforesis se llevó a 70V. Antes de su corrimiento del gel se cargó el marcador de peso molecular (Thermo Fisher). Posterior fue teñido con azul de Commasi.

Extracción de Hidrocarburos

Cada 24 horas se sacrificó una botella serológica, los 1.5g del EPU fueron colocados en tubos falcón a los cuales se les adiciono una mezcla de hexano/acetona (1:1) de 40ml, posteriormente se agitaron durante 4 horas, y centrifugados 6000rpm para recuperar el pireno residual. Las muestras fueron leídas en HPLC con un Flujo: 1ml/min, volumen de inyección: 5µl, T°25°C, presión de columna: 230 psi, durante 7 minutos en un gradiente 100% acetonitrilo. Los resultados se comparan con una curva de calibración.

RESULTADOS

Al tercer día de la fermentación en PUF, se tomaron microfotografías en un microscopio Zeiss a 40x. figura 1, se observa el crecimiento *T. asperellum* H15, tanto en presencia como en ausencia de pireno, lo cual demuestra su capacidad de crecimiento en presencia del contaminante. Mientras que en la gráfica 2. Se observa la degradación del pireno durante diez días llevada a cabo por *T. asperellum* H15, siendo notable que la degradación se observa en los primeros días esto posiblemente a que es cuando el hongo utiliza la sacarosa como fuente de carbono y empieza el metabolismo del pireno, la eficiencia de extracción fue de un 95%. Mientras que en la figura 2 se muestran los resultados obtenidos de los tres métodos de lisis llevados a cabo en *T. asperellum* H15, en la fig.2. (1a), se muestra el tratamiento con lisis alcalina tanto del grupo control como en presencia del pireno, mientras que en la fig. 2.a está en presencia, las muestras fueron calentadas por 10 minutos, lo mismo sucede para la fig.2, 2a y 2b, solo que el tiempo fue de 20 minutos. Mientras que para la fig. 2. 3a, se observa en ausencia y la 2b, en presencia de pireno el tiempo de sonicación fue por 20 minutos, y en la fig. 1. 4a en ausencia y en la fig.1. 4b en presencia de pireno, el tiempo de sonicación fue por 30 minutos por último la fig. 1. 5a en ausencia y 5b en presencia de pireno con tratamiento con fenol. Por último, en la figura 3, se hicieron observaciones microscópicas de cada uno de los tratamientos realizados tanto en presencia como en ausencia de pireno. Esto con la finalidad de corroborar que efectivamente los procesos de disrupción celular se estaban llevando a cabo.

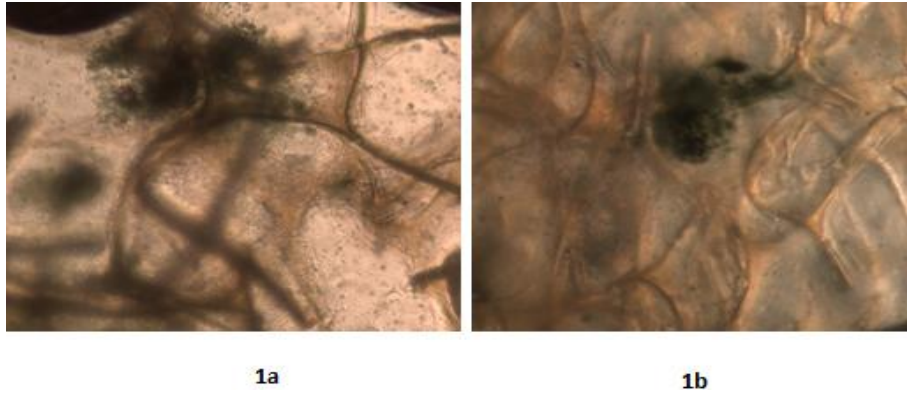


Figura 1. Microfotografías de *T. asperellum* H15 en cultivo sólido usando EPU control (1a), y en presencia de pireno (2b), las observaciones fueron hechas con un microscopio óptico al 40x.



Gráfica 1. Porcentaje de remoción de pireno durante el proceso de biodegradación llevada a cabo por *T. asperellum* H15

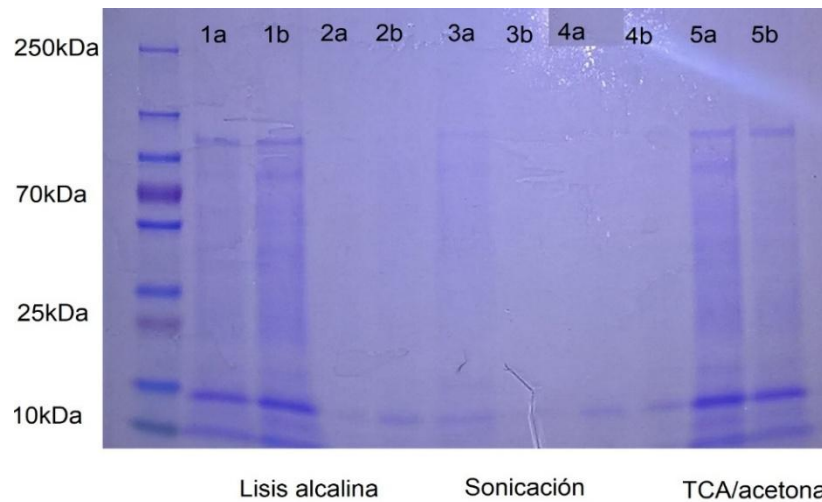


Figura 2. Extracción de proteínas de *T. asperellum* H15 en EPU. En los tres tratamientos se puede observar las diferencias en el patrón de bandas.

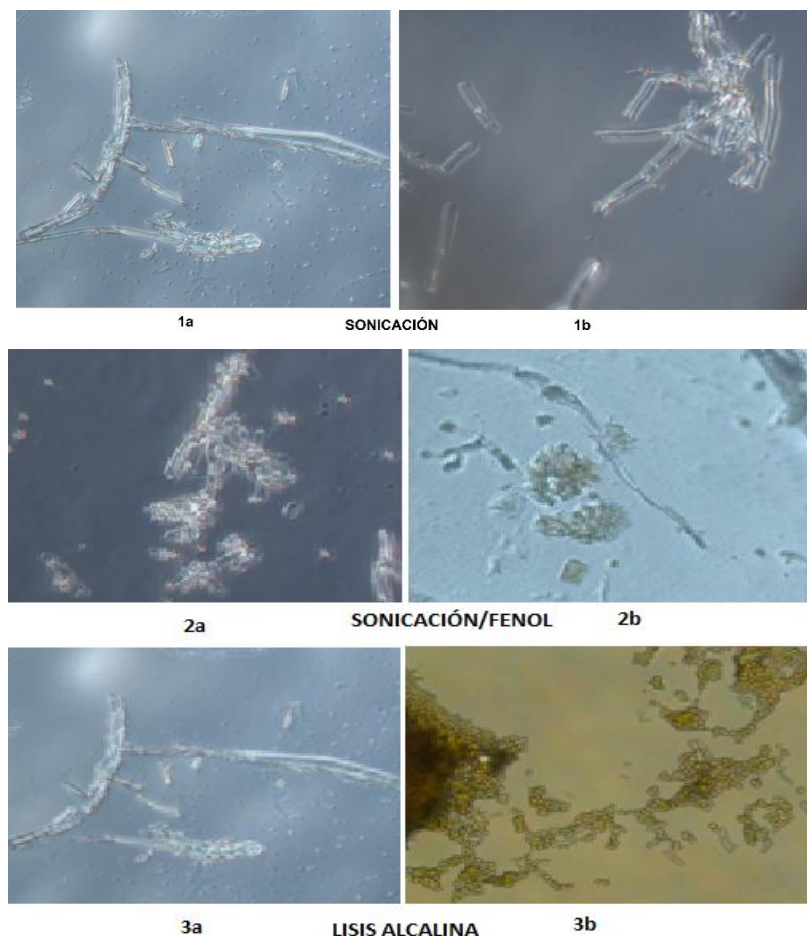


Figura 3. Microscopia de *T. asperellum* H15 después de haberse llevado a cabo la ruptura celular de los tres tratamientos descritos. (1a), (2a), (3a) sin la presencia de pireno, (1b), (2b) y (3b) en presencia de pireno. Las observaciones microscópicas fueron hechas en un microscopio óptico al 100x.

CONCLUSIÓN

Existen diferentes métodos desarrollados para la extracción de proteínas, las distintas metodologías han mostrado ser más poderosas y decisivas con respecto al número de proteínas identificados [3]. En nuestro ensayo de los tres protocolos realizados, el que mejor resultado para nuestro estudio, es el tratamiento con TCA/Acetona- fenol/metanol, ya que como se observa, hay un mayor de fraccionamiento de bandas presentes y definidas a comparación de los dos tratamientos descritos, esto se debe posiblemente a que este método elimina algunos contaminantes que son abundantes en material fúngico (como polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, o compuestos fenólicos) que afectan las proteínas en los procesos de la electroforesis [7]. Otro factor que se debe considerar es la precipitación de las proteínas, la precipitación con TCA acetona o acetona es uno de los más eficientes métodos y utilizados, sin embargo, en el tratamiento con sonicación y lisis alcalina se basan en estos procedimientos. La desventaja que ha mostrado el TCA es que requiere lavados extensos para eliminar los residuos, por consiguiente, existe pérdida de muestra [1]. Debido a ello posiblemente la lisis alcalina y la sonicación resulto ser menos eficiente. Por otra parte, se observó que *T. asperellum* H15 llego a degradar hasta un 24% lo que demuestra que existen ciertas enzimas y/o proteínas implicadas en el metabolismo de este hongo, lo cual sugiere que existen cambios en la composición proteica que deberán ser estudiados.

BIBLIOGRAFIA

1. Bianco, L.; Perrota, G. Methodologies and Perspectives of Proteomics Applied to filamentous fungi: From Sample Preparation to secretome analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 5803-5829.
2. Chourey, K., Jansson, J., VerBerkomes, N., Shah, M., Chavarrita, K.L., Tom, L.M., Brodie, E.L., Hettich, R.L., 2010. Direct cellular lysis/protein extraction protocol for soil metaproteomics. *Journal of Proteome Research* 9, 6615-6622.
3. Grinyer J, Hunt S, McKay M, Herbert BR, Nevalainen H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet.* 2005;47:381-388.
4. Kim, S.T.; Yu, S.; Kim, S.G.; Kim, H.J.; S.Y; Hwang, Y.S.; Kang, K.Y. Proteome analysis of rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) proteome during appressorium formation. *Proteomics* 2004, 4, 3579-3587.
5. Nandakumar MP, Marten MR. Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis.* 2002; 23:2216-2222.
6. R. González-Fernández, J.V. Jorrín Novo. Proteomics protocols for the study of filamentous fungi V.K. Gupta, M.G. Tuohy, M. Ayyachamy, K.M. Turner, A. O'Donovan (Eds.), *Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal biology*, Springer, New York, Heidelberg, Dordrecht, London (2013), pp.229-308.
7. Zafra G, Moreno-Montano A, Absalon AE, Cortes-Espinosa DV (2015a) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environ Sci Pollut Res* 22:1034–1042

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE LENTEJA (*LENS CULINARIS*) MEDIANTE EL USO DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO.

Jessica Almanza_Acevedo, Ana María Vázquez_Jerónimo y Stephanie Montzerrath
Ambríz_Álvarez, Blanca Estela Gómez Luna, Juan Carlos Ramírez Granados
Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, División de Ciencias de la Salud e
Ingeniería, Ingeniería en Biotecnología.

RESUMEN

Las leguminosas son alimentos básicos, importantes por su alto contenido en almidón y proteínas. Las lentejas son gran fuente de nutrientes. De acuerdo al sistema de información Agroalimentario y Pesquero (SIAP) 2015. Se produce principalmente en Michoacán (61%) y Guanajuato (39%). Y se comercializan poco más de 600 toneladas, las cuales son enviadas a varios estados del país.

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, la tolerancia a estrés ambiental y, en general, el mantenimiento de la salud radicular, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos. Algunas bacterias que están asociadas a las raíces de las plantas ayudan al crecimiento y protección de plantas.

Se estableció como hipótesis que las cepas bacterianas 313, 225 y 275 ayudan al crecimiento y protección de ciertas plantas por lo tanto se planteó como objetivo, evaluar el efecto que tienen dichas cepas sobre el crecimiento de la planta de lenteja.

Los métodos se dividieron en 3 etapas, la germinación, obtención de plántulas y evaluación de crecimiento de las plantas con bacterias.

Los resultados fueron a los pocos días, se observó un crecimiento notable en las plantas en las que se aplicó inóculo, a comparación del observado en el control sin bacterias.

Se concluyó que la cepa 275 fue la que presentó mejores resultados en la germinación, crecimiento y número de hojas en la planta de lenteja. Esta cepa bacteriana tiene potencial biotecnológico para ser utilizado en producción de alimentos.

INTRODUCCIÓN

Los cereales constituyen la principal materia prima de la que depende el mundo para su alimentación (arroz y trigo principalmente). Las leguminosas constituyen otro grupo de alimentos básicos, como los guisantes, garbanzos y lentejas. Todos ellos son importantes por su alto contenido en almidón y proteínas. La lenteja es una semilla que puede llegar a conservarse hasta 4 o 5 años y su periodo de dormancia es relativamente corto.

En el mundo, la producción de lentejas asciende a 3.850.000 toneladas, destacándose como principales países productores:

India (29,0%), Canadá (24,5%), Turquía (14,5%), Australia (5,7%), Estados Unidos (4%) y China (3,9%), que obtienen el 81 % del volumen global.

- Los principales consumidores se concentran en Asia, el norte de África, Europa Occidental y parte de Latinoamérica.
- Los mayores importadores son Argelia y Egipto seguidos por Bangladesh, Sri Lanka, India y Pakistán. En Europa, sobresalen España, Francia, Italia y Alemania.
- En Latinoamérica los países de la Comunidad Andina y Brasil integran un mercado importador de aproximadamente 140.000 toneladas.

De acuerdo con cifras del sistema de información Agroalimentario y Pesquero (SIAP) 2015, Michoacán es líder nacional en producción de lenteja, con más de 3 mil 300 toneladas producidas.

Se comercializan poco más de 600 toneladas del producto, las cuales son enviadas a varios estados del país, dentro de los que destacan: Estado de México, Veracruz, Guerrero, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Guanajuato y Michoacán. Solo se produce en dos entidades: Michoacán tiene el 61% de la producción y Guanajuato el 39% restante (Díaz, 2001, Laredo, 2004, Cuvás, 2013).

Por cada 100 gramos de lentejas nos encontramos con los siguientes valores nutricionales:

Calorías: 336 Kcal; Proteínas: 25 gramos. Tiene el aporte equivalente a 160 gramos de carne.

Hierro: 8.6 mg. El triple que la carne, de ahí su importancia. Magnesio: 80 mg.

Fósforo: 412 mg. Siendo esta cantidad la mitad de la cantidad diaria recomendada.

Potasio: 790 mg; Fibra: Aporta alrededor del 12% de la fibra necesaria, convirtiendo las lentejas en un alimento de fácil digestión.

Hidratos de carbono: 54 g; Calcio: 60 mg. Muy importante para los huesos; Lípidos: 25 g
Vitamina B1: 0.50 mg., Nos aporta casi una cuarta parte de lo que necesitamos en un día.
Vitamina B6: 0.60 mg., Es muy beneficiosa en estados de depresión psicológica, pérdida de peso, somnolencia o irritabilidad.

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes del suelo, la tolerancia a estrés ambiental y, en general, el mantenimiento de la salud radicular, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos.

En la promoción directa las bacterias sintetizan metabolitos que facilita a las plantas, la toma de ciertos nutrimentos a partir del ambiente, estos mecanismos son: fijación de nitrógeno; síntesis de fitohormonas, vitaminas y enzimas; solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico; oxidación de sulfuros; incremento en la permeabilidad de la raíz; producción de nitritos; acumulación de nitratos; reducción de la toxicidad por metales pesados

Algunas bacterias que están asociadas a las raíces de las plantas ayudan al crecimiento y protección dando como consecuencia una producción más eficiente y más rápida. Estos tipos de bacterias pueden estimular el crecimiento a través de mecanismos como síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno y solubilización de nutrimentos.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas PGPR por su acrónimo en inglés "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" constituyen excelentes alternativas biotecnológicas para mejorar el rendimiento de los cultivos de interés agronómico, permitiendo una mayor producción y calidad en los productos de las plantas (Díaz, 2001, Loredó, 2004, Rives, 2007, Gómez, 2016).

Las rizobacterias ejercen efectos benéficos a través de mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. La promoción directa ocurre cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilita a las plantas, la toma de ciertos nutrimentos a partir del ambiente, estos mecanismos son: fijación de nitrógeno; síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas), vitaminas y enzimas; solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico; oxidación de sulfuros; incremento en la permeabilidad de la raíz; producción de nitritos; acumulación de nitratos (Díaz, 2001, Loredó, 2004, Cuvas, 2013).

Las rizobacterias han sido ampliamente utilizadas en algunos cultivos de importancia agrícola donde se ha demostrado que incrementan el rendimiento y la calidad de frutos (Díaz, 2001, Loredó, 2004, Rives, 2007, Cuvas, 2013, Gómez, 2016).

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico, se utilizaron tres cepas de rizobacterias previamente aisladas de suelos de áreas naturales protegidas con clave 225, 275 y 313. Estas rizobacterias se aislaron en medio selectivo para actividad de ACC desaminasa. Para la preparación del inoculo las bacterias se inocularon en medio líquido de extracto de papa y se incubaron 24 h a 28°C. Semillas de lentejas *Lens culinaris*, peat moss sustrato para germinar y desarrollo de la planta.

Se evaluó el porcentaje de germinación de semillas de lenteja, las semillas se colocaron en un caldo con el cultivo de cada una de las cepas por 30 min y se colocaron en cajas Petri con papel húmedo a 28°C.

El diseño experimental, se prepararon cuatro tratamientos con 30 plantas cada tratamiento, los tratamientos fueron: T1: No se aplican bacterias, T2: cepa 313, T3: cepa 225 y T4: cepa 275.

Para la preparación de las cepas para inocular las plantas, cada cepa fue inoculada en medio de caldo de extracto de papa con agitación a 28°C por 24 h, la densidad del inoculo a 1×10^6 UFC/ml. Se agregaron a las plantas en la segunda semana de germinación.

Se midió el desarrollo de las plantas cada mes por tres meses y al final de I experimento se determinaron las variables agronómicas: longitud, número de hojas y biomasa.

Para el análisis estadístico se utilizó bloques al azar y análisis de varianza.

RESULTADOS

Efecto en germinación se mejora el porcentaje de germinación hasta en un 66%, al aplicar las bacterias desde semilla.



Figura 1. Efecto en el porcentaje de germinación en semillas de lenteja.

Las semillas tratadas con las cepas de rizobacterias presentaron disminución en el tiempo de germinación, aumento en el porcentaje de germinación y mayor desarrollo de la radícula.

La aplicación de las rizobacterias mostro un resultado positivo al incrementar el crecimiento de las plantas de lenteja de forma significativa comparado con el control (sin bacteria), los datos indicaron además diferencias en las capacidades de promoción de crecimiento entre las cepas utilizadas como se indica en la Tabla 1, la cepa 275 proporcionó a la planta el mejor crecimiento en altura, número de hojas y biomasa.

Tabla 1. Efecto de las cepas de rizobacterias en el crecimiento de plantas de lenteja.

Tratamiento	Altura (cm)	Número de Hojas	Biomasa (g)
Control	22 (1.6) c	26 (4.3) d	3.8 (0.2) c
313	22 (1.0) c	39 (5.5) c	4.2 (0.2) b
225	25 (1.2) b	45 (5.5) b	4.5 (0.3) b
275	30 (1.3) a	61 (5.7) a	5.6 (0.2) a

Los valores son promedio de 30 plantas en cada tratamiento, () es desviación estándar, las letras indican diferencia entre tratamientos. Control no contiene aplicación de bacterias y 313, 225 y 275 contienen aplicación de estas cepas.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se puede decir que las bacterias promotoras de crecimiento de plantas, son una herramienta biotecnológica que pudiera tener un gran impacto en el campo agrícola ya que son microorganismos que promueven el crecimiento de plantas, mejoran la salud vegetal y podemos decir que previenen enfermedades mediante mecanismos de defensa contra fitopatógenos, ya que nuestras plantas no fueron susceptibles a plagas. El desarrollo de microvellosidades en las raíces permite una toma de nutrientes más efectiva. Lo que nos indica el potencial biotecnológico que presentan estas cepas para ser utilizadas en proyectos de mejora de producción de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. R. B. Cuvas Limon, "Evaluación de bacterias promotoras de crecimiento, en plántulas de maíz y sorgo, aisladas de diferentes regiones de México", (2013), pp. 1-91.
2. P. Díaz Vargas, "Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga". Terra Latinoamericana, Vol. 19, 4, (2001), pp. 327-335.
3. C. Loredo-Osti, "Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión". Terra Latinoamericana, Vol. 22, 2, (2004), pp. 225-239.
4. N. Rives, "Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.), Perspectivas de su uso en Cuba", Cultivos Tropicales, Vol. 28, 2, (2007), pp. 29-38.
5. B. E. Gómez-Luna. "Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento de plantas de zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato". En Inducción a la Ciencia, la tecnología y la innovación en la Región Centro UASLP, Vol. 2, 4, (2016), pp. 288-293.

POTENCIAL DE CUATRO ESPECIES HALÓFITAS COMO ALTERNATIVA SUSTENTABLE PARA REMEDIAR SUELOS SALINOS

Marcos Alfonso Lastiri-Hernández¹, Dioselina Álvarez Bernal¹, Marina Olivia Franco-Hernández² y Gustavo Cruz-Cárdenas¹

¹Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Michoacán, ²Instituto Politécnico Nacional- UPIBI.

RESUMEN

En la región de la Ciénega de Chapala porción Michoacán la mayor parte de los cultivos forrajeros son el sustento fundamental de los sistemas ganaderos tradicionales. Sin embargo, la escasez de agua y la creciente salinidad son dos factores ambientales limitantes que afectan directamente a su establecimiento y desarrollo. En esta investigación, se evaluó la capacidad de fitodesalinización, de *Bacopa moinneri* Pennell, *Sesuvium verrucosum*, *Flaveria trinervia* y *Trianthema portulacastrum* a nivel invernadero y bajo condiciones de no lixiviación en el transcurso de 170 días. El experimento se realizó bajo una temperatura promedio de 42°C/15°C (día/noche) y de 60% (\pm 10%) de humedad relativa. Las macetas empleadas no se perforaron y llenaron con 8 kg de suelo arcilloso con una ECe de 6.62 dS m⁻¹. Se analizaron las muestras de suelo para determinar la conductividad eléctrica del extracto de pasta de saturación (ECe), contenido de cationes solubles e intercambiables (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺). Luego, las especies halófitas se dividieron en categorías (hoja, tallo y raíz) y se determinó la producción de biomasa de su brote y el contenido de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺. Se realizó un análisis de varianza para examinar los efectos de la salinidad en cada una de las variables evaluadas; La prueba de Tukey se utilizó para detectar diferencias entre los valores medios de las variables por tratamiento. En los resultados se observó una respuesta diferencial entre las cuatro especies, al producir una reducción drástica en los niveles de salinidad respecto a sus propios testigos. También se observó que de las cuatro especies estudiadas, *Sesuvium verrucosum* presenta el mayor potencial fitodesalinizador para mejorar las características edáficas del suelo.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Hasanuzzaman et al. (2014), la salinidad es el resultado de procesos naturales (erosión de material parental, la deposición de sal marina realizada por el viento y la lluvia, inundación de tierras costeras por las mareas, etc.) y actividades antropogénicas (ascenso del nivel freático debido a un exceso de riego con agua subterránea, el riego con aguas salinas, el drenaje deficiente, etc.) que conducen en menor o mayor grado a una acumulación de sales, que afectan la fertilidad del suelo.

Lo cierto es que la salinidad avanza a pasos agigantados, a nivel mundial la superficie afectada es de 8.97 millones de km² (Ruiz et al., 2012). En México, la salinidad se presenta principalmente en zonas áridas y semiáridas representando un 10% del área de tierras de regadío, donde las precipitaciones pluviales son reducidas para llevar las sales fuera de la zona explorada por las raíces de las plantas. En la Ciénega de Chapala porción Michoacán, los procesos de salinización son cada día mayor con una superficie total de 46 171 hectáreas. De las cuales en el año de 1992 había 5000 ha con problemas de salinización e incremento a 25 000 ha en el año 2002 que presentan salinidad ligera a moderada (Silva et al., 2006).

La salinidad puede restringir severamente el crecimiento de las plantas, sin que presenten ningún síntoma agudo de daño, lo cual puede conducir a una pérdida del rendimiento sin que el agricultor se dé cuenta de que la salinidad es la causa. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la salinidad del suelo es tan variable que se presentan en el campo manchones sin plantas, áreas con plantas severamente achaparradas y manchones de plantas normales.

Ante tal situación surge la necesidad de buscar alternativas que coadyuven a retornar el ambiente alterado a su condición natural, por lo tanto, se han utilizado métodos físicos, químicos y biológicos, en ésta categoría se encuentra la fitorremediación, que es el uso de plantas para descontaminar ambientes, en el caso de salinidad de suelos se han empleado especies halófitas, las cuales son capaces de sobrevivir, completar su ciclo de vida en un entorno rico en sales e incluso expresar su máximo potencial de crecimiento y producción en condiciones de elevada salinidad, donde casi el 99% de las especies sensibles a la sal mueren a causa de la toxicidad. Según Apse y Blumwald (2007), las halófitas toleran estos iones debido a su capacidad superior para secuestrar Na⁺

citotóxico en las células de las raíces y las vacuolas de las hojas; éstas especies pueden ser sustitutas de los cultivos convencionales, y pueden ser una buena fuente de alimento, combustible, forraje, fibra, aceites esenciales, y medicina (Lokhande y Suprasanna, 2012).

Para llevar a cabo una fitorremediación o con mayor precisión una fitodesalinización es necesario que se utilicen plantas nativas, por lo tanto, en el área de la Ciénega de Chapala porción Michoacán, existe una zona donde se han identificado varias especies halófitas, algunas de ellas son: *Bacopa monnieri*, *Sesuvium verrocosum*, *Flaveria trinervia* y *Trianthema portulacastrum*, por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el potencial de estas cuatro especies halófitas como alternativa sustentable para remediar suelos salinos.

PARTE EXPERIMENTAL

El suelo se tomó a una profundidad de 0 a 30 cm de un sitio ubicado en el municipio de Villamar, Michoacán (20° 03' 11" N y 102° 36' 20" W), a una altitud de 1540 m sobre el nivel del mar (SMN, 2017). La textura del suelo fue arcillosa, con una conductividad eléctrica (CEe) de 6.2, un pH de 8.18, 4.12% de materia orgánica (% MO), una densidad aparente (DA) de 1.02, un porcentaje de porosidad de 61.21, una capacidad de retención de agua (CRA) del 120%, una relación de adsorción de sodio (RAS) de 42.40 (mmolc L-1)^{1/2}, una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 105.13 cmolc kg-1 y un porcentaje de sodio intercambiable (PSI) de 37.86. Las especies se colectaron de la localidad de los Negritos, una zona geotérmica perteneciente al municipio de Villamar, Michoacán (20° 03' 47" N y 102 ° 36' 52" W).

Para el experimento en el invernadero se tomaron aproximadamente 450 kg de suelo, se secaron a la sombra y se transfirieron a tubos de cloruro de polivinilo (PVC) de 45 cm de altura y 16 cm de diámetro interior. Los tubos se encontraban sin perforar y cada uno fue llenado con 8 kg de suelo. Se trasplantaron 5 g de peso seco de material vegetal de *B monnieri*, *S. verrucosum*, *T. portulacastrum* y *F. trinervia* en cada uno de los tubos de PVC (1 planta por tubo), regados con agua del grifo hasta el 50% de la capacidad de contenedor. El experimento finalizó a los 170 días después del trasplante del material vegetal de cada una de las especies (Rabhi et al., 2009), se consideraron 5 tratamientos con 10 repeticiones para cada una de las especies, el diseño experimental fue completamente al azar. En promedio, las condiciones de temperatura y humedad relativa en el invernadero fueron 38/10 °C (día / noche) y 60% (± 10%), respectivamente. El experimento se realizó tres veces. La capacidad de fitodesalinización de cada una de las halófitas fue estimada a partir de su peso seco.

El análisis de tamaño de partícula de los suelos se realizó de acuerdo con el método de Gee y Bauder (1996). La ECe, el RAS y PSI se determinaron en el extracto de pasta de saturación. Las muestras de suelo se tomaron aleatoriamente, se secaron, se molieron y se hicieron pasar por un tamiz de apertura de malla de 2 mm, antes de añadir agua destilada hasta saturación. Las pastas saturadas obtenidas se cubrieron y dejaron durante una noche a temperatura ambiente. La extracción se realizó a vacío. La ECe y las concentraciones de Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ se midieron en los extractos.

Se analizó químicamente el material vegetal de cada especie. Las plantas fueron lavadas con agua destilada; las raíces y parte aérea (tallos y hojas) fueron separadas y cuantificadas por sus pesos frescos y secos (g). Las muestras se secaron en horno a 70 °C durante 48 h antes de ser trituradas. Se empleó un microondas Multiwave Go de Anton Paar para la digestión ácida de las muestras. Los extractos se filtraron en papel y se analizaron las concentraciones de Na⁺, K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺, mediante espectroscopia de absorción atómica (Allen, 1989), utilizando un espectrómetro SensAA, tanto para suelo como para planta.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza con separación de medias por Tukey (P ≤ 0.05), para encontrar las diferencias significativas entre los tratamientos. Todos los análisis se realizaron utilizando el software SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2004).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra el contenido de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ de la raíz (R) y parte aérea (TH) de las especies *B. monnieri*, *S. verrucosum*, *T. portulacastrum* y *F. trinervia* después de ser expuestas a un suelo moderadamente salino bajo condiciones de no lixiviación, durante un periodo de 170 días.

Tabla 1. Cationes en especies halófitas después de 170 días de fitodesalinización.

Tratamientos	Órgano	(mg g ⁻¹ peso seco)			
		Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
<i>B. monnieri</i>	R	19.68 ^e	3.75 ^d	4.14 ^e	2.72 ^e
	TH	35.55 ^d	7.64 ^c	9.21 ^d	5.19 ^d
<i>S. verrucosum</i>	R	12.44 ^g	2.92 ^e	3.89 ^e	2.58 ^e
	TH	78.35 ^a	15.6 ^a	18.67 ^a	11.02 ^a
<i>T. portulacastrum</i>	R	17.45 ^f	3.45 ^{de}	4.36 ^e	3.05 ^b
	TH	61.36 ^b	10.5 ^b	13.22 ^b	8.73 ^b
<i>F. trinervia</i>	R	15.47 ^e	3.69 ^d	4.40 ^e	2.64 ^e
	TH	57.11 ^c	9.92 ^b	11.83 ^c	6.67 ^c

Letras distintas representan diferencia significativa en cada fila, de acuerdo a la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). n=10, (R: Raíces; TH: Tallo y hojas).

La especie con la mayor acumulación en el contenido de cationes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺) en la parte aérea, fue *S. verrucosum*, seguida de *T. portulacastrum*, *F. trinervia* y *B. monnieri*.

La tabla 2 muestra la conductividad eléctrica (ECe), el pH, % de materia orgánica (MO), los cationes solubles e intercambiables del suelo, la relación de adsorción de sodio (SAR), el porcentaje de sodio intercambiable (ESP) y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) a una profundidad de 40cm después de exponer a las especies *B. monnieri*, *S. verrucosum*, *T. portulacastrum* y *F. trinervia* a un suelo moderadamente salino bajo condiciones de no lixiviación.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del suelo inicio y final de la fitodesalinización por 170 días.

Parameters	Treatments					
	Control		<i>B. mon</i>	<i>S. ver</i>	<i>T. port</i>	<i>F. trin</i>
Profundidad (0 - 40 cm)	I	F	F	F	F	F
ECe (dS m ⁻¹)	6.21 ^a	6.27 ^a	4.9 ^b	4.1 ^d	4.60 ^c	4.51 ^c
pH	8.18 ^a	8.2 ^a	8.06 ^b	7.9 ^c	8.05 ^{cb}	8.03 ^c
% MO	4.12 ^a	4.2 ^a	4.81 ^b	5.19 ^d	5.1 ^c	5.07 ^c
Na ⁺ (mmol _c L ⁻¹)	127.28 ^a	133.59 ^a	96.01 ^b	68.80 ^d	86.02 ^c	86.42 ^c
Ca ²⁺ (mmol _c L ⁻¹)	5.37 ^a	5.9 ^a	4.31 ^b	2.32 ^d	3.55 ^c	3.63 ^c
Mg ²⁺ (mmol _c L ⁻¹)	12.69 ^a	13.41 ^a	9.89 ^b	7.26 ^d	9.05 ^b	8.88 ^c
Na ⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	39.79 ^a	41.71 ^a	31.12 ^b	23.47 ^d	23.61 ^d	26.69 ^c
K ⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	4.28 ^c	4.67 ^c	5.72 ^b	7.03 ^a	6.31 ^b	5.95 ^b
Ca ²⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	29.47 ^e	30.18 ^e	37.89 ^d	44.97 ^a	42.75 ^b	40.91 ^c
Mg ²⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	31.58 ^a	32.27 ^a	26.5 ^b	20.94 ^e	23.21 ^d	25.42 ^c
SAR (mmol _c L ⁻¹) ^{1/2}	42.39 ^a	42.98 ^a	36.03 ^b	31.44 ^d	34.26 ^c	34.58 ^c
ESP	37.86 ^a	38.32 ^a	30.73 ^b	24.44 ^d	26.17 ^c	26.96 ^c
CEC (cmol _c kg ⁻¹)	46.74 ^a	46.81 ^a	50.08 ^b	52.09 ^d	51.51 ^{cd}	51.05 ^c

Letras distintas representan diferencia significativa en cada fila, de acuerdo a la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). n=10, (R: Raíces; TH: Tallo y hojas).

Los tratamientos evaluados mostraron una alta capacidad para extraer sodio del suelo respecto al testigo, debido a que la conductividad eléctrica (ECe) disminuyó 21.85, 34.60, 26.63 y 28.08% en los tratamientos de *B. monnieri*, *S. verrucosum*, *T. portulacastrum* y *F. trinervia* respecto al testigo; este resultado coincide con los reportados por Rahbi et al. (2010), quienes señalaron que la tendencia a la reducción en la conductividad eléctrica del suelo se debe a la actividad de las raíces para liberar los cationes Na⁺ en el suelo. Así también el pH se redujo en el suelo cultivado con las halófitas respecto al testigo, al presentar disminuciones de 1.7, 3.65, 1.82 y 2.07% en los tratamientos de *B. monnieri*, *S. verrucosum*, *T. portulacastrum* y *F. trinervia* respectivamente. Cabe destacar que de

acuerdo a los resultados del resto de los parámetros evaluados indican una mejora en las propiedades edáficas del suelo.

La tabla 3 muestra la estimación de la capacidad de desalinización del suelo en relación a las especies halófitas utilizadas en este experimento, siendo *S. verrucosum* la especie que presentó un mayor potencial fitodesalinizador.

Tabla 3. Capacidad de desalinización de las especies halófitas después de 170 días

Parámetros	Tratamientos			
	<i>B. mon</i> F	<i>S. ver</i> F	<i>T. port</i> F	<i>F. trin</i> F
Peso seco final por maceta (g)	9.88 ^a	13.02 ^d	12.69 ^c	11.93 ^b
Na ⁺ exportado (g pot ⁻¹)	0.173 ^a	0.626 ^d	0.471 ^c	0.396 ^b
Na ⁺ exportado (kg Ha ⁻¹)	86.5 ^a	313 ^d	235.5 ^c	198 ^b

Letras distintas representan diferencia significativa en cada fila, de acuerdo a la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). n=10, (R: Raíces; TH: Tallo y hojas).

Las especies aquí utilizadas demostraron que tienen el potencial para desalinizar suelos salinos, principalmente la especie *S. verrucosum*, por lo tanto, después de utilizarse estas especies para fitodesalinizar, una buena opción sería usarlas como forraje debido a que posterior a el experimento su biomasa es 1.5 veces mayor que al inicio del experimento.

CONCLUSIONES

Las cuatro halófitas nativas de la región analizadas mostraron su potencial para fitodesalinizar un suelo con características moderadamente salinas y producir grandes cantidades de biomasa, a una profundidad de 40 cm, en invernadero y bajo condiciones de no lixiviación. La especie *S. verrucosum*, demostró ser la halófito más eficiente para reducir los niveles de salinidad, seguida de las especies *T. portulacastrum*, *F. trinervia* y *B. monnieri*.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. Apse, E. Blumwald, E. "Na⁺ transport in plants". FEBS letters, 581(12), 2007, 2247-2254.
2. W. Gee, W. Bauder, "Particle size analysis. In: Klute, A. (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 1 Physical and Mineralogical Methods, second ed. Soil Science Society of America Inc., American Society of Agronomy, Inc.,(Madison, Wisconsin, USA, 1986.) pp. 383-411.
3. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. Alam, P. Bhowmik, M. Hossain, M. Rahman, M. Fujita, "Potential Use of Halophytes to Remediate Saline Soils". BioMed research international, 2014.
4. V. Lokhande, P. Suprasanna, "Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance". In *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change* (Springer New York, 2012).pp. 29-56
5. M. Rabhi, S. Ferchichi, J. Jouini, M. Hamrouni, H. Koyro, A. Ranieri, A. Smaoui, "Phytodesalination of a salt-affected soil with the halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. to arrange in advance the requirements for the successful growth of a glycophytic crop". Biores. Techno., 101(17), 2010, 6822-6828.
6. M. Rabhi, C. Hafs, A. Lakhdar, S. Hajji, Z. Barhoumi, M. Hamrouni, A. Smaoui, "Evaluation of the capacity of three halophytes to desalinize their rhizosphere as grown on saline soils under nonleaching conditions". African J. Ecol., 47(4), 2009 463-468.
7. E. Ruiz Cerda, R. Aldaco Nuncio, M. Trejo, M. Fortis Hernández, J. Olague Ramírez, J. Villagómez Gamboa, "Aprovechamiento y mejoramiento de un suelo salino mediante el cultivo de pastos forrajeros". Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 45(1), 2012, 19-24.
8. SAS. SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. (Cary, NC, 2004). SAS Institute Inc. USA, 5136 pp.
9. T. Silva-García, S. Ochoa-Estrada, D. Cristóbal-Acevedo, F. Estrada-Godoy, "Calidad química del agua subterránea de la Ciénega de Chapala como factor de degradación del suelo". Terra Latinoamericana, 24(4), 2006, 503-513.

10. SMN. Clima: Consultado el 10/02/2017, desde.
<http://smn.cna.gob.mx/tools/RESOURCES/Normales8110/NORMAL16186.TXT>

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE EN *PESTALOTIOPSIS SPP*

Pedro Castruita Domínguez¹, Lérica Liss Flores Villavicencio², Gustavo Cruz Jiménez³, Gil Virgen Calleros⁴, Mónica Limón Corona¹, Cecilia Neri Luna¹, Julio César Villagómez Castro², Pablo Cardoso Avila⁵, Juan Luis Pichardo Molina⁵

¹Departamento de Ecología y ⁴Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara. casdompe@hotmail.com

²Departamento de Biología y ³Departamento de Farmacia, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. castroj2407@hotmail.com

⁵Grupo de Espectroscopia Biomédica y Nanomateriales, Centro de Investigaciones en Óptica, A. C. León, Guanajuato. jpichardo@cio.mx

RESUMEN

México es el cuarto país productor de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) a nivel mundial y una enfermedad recurrente que afecta a esta planta es el cáncer de tallo, asociado principalmente a *Pestalotiopsis spp.* Actualmente para el control de hongos fitopatógenos se utilizan fungicidas, los cuales ocasionan un severo impacto en el ecosistema y generan resistencia en estos microorganismos. Una alternativa a esta problemática es el uso de nanopartículas de óxido de cobre (CuO), las cuales presentan un amplio espectro antimicrobiano. En el presente trabajo se determinó la actividad antifúngica de las NPs CuO, con un tamaño promedio de 8.0 ± 3.0 nm, sobre *Pestalotiopsis spp.* Para ello, el efecto de las nanopartículas se determinó a través de la actividad metabólica mitocondrial, la cual es dependiente de la concentración (0.0009 – 2 g/L) y del tiempo de exposición (24 - 120 h). A nivel morfológico, la exposición a concentraciones de 0.5 – 2 g/L de NPs CuO, inhibe el proceso de diferenciación de conidio a micelio, mientras que en concentraciones menores a 0.5 g/L ocurre la diferenciación, sin embargo, las hifas presentan alteraciones morfológicas. En el caso de las plántulas de arándano, se determinó el efecto de las NPs de CuO a concentraciones de 0.125 y 2 g/L durante un periodo de 8 días, determinando la variación en la concentración de clorofila y la longitud del tallo y la raíz. Las plántulas tratadas con las nanopartículas no mostraron cambios significativos con respecto a las no tratadas. Nuestros resultados sugieren, a reserva de incrementar las evidencias experimentales, que las NPs de CuO pudieran utilizarse para tratar la infección de *Pestalotiopsis spp.* en las plántulas de *V. corymbosum*.

INTRODUCCIÓN

México es el cuarto país productor de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) a nivel mundial, con una producción total de 18,031 toneladas. Jalisco, Michoacán, Sinaloa, Colima, Baja California, Puebla, México, Sonora y Guanajuato aportan el 96 % de la producción total nacional de arándano azul, el cual es exportado principalmente a Estados Unidos (SAGARPA, 2017). El principal problema fitosanitario en el arándano se debe a los hongos que impactan en el crecimiento de la planta y su producción. Específicamente, *Pestalotiopsis spp.* es un hongo que causa el cáncer de tallo con una incidencia progresiva (1, 2). Actualmente las estrategias de control de hongos fitopatógenos en el arándano no están plenamente desarrolladas, si bien, existen en el mercado varios fungicidas que desafortunadamente ocasionan un severo impacto en el ecosistema y generan la aparición de resistencia en estos microorganismos. Una alternativa para resolver esta problemática es el uso de NPs de CuO, las cuales han recibido gran atención debido a sus interesantes propiedades fisicoquímicas y posibles aplicaciones microbiológicas debido a su amplio espectro antimicrobiano (3). En el presente estudio, se determinó la actividad antifúngica de las NPs CuO con un tamaño promedio de 8.0 ± 3.0 nm sobre *Pestalotiopsis spp.*, con base a la determinación de la actividad metabólica mitocondrial en el micelio y la germinación de los conidios de éste hongo.

PARTE EXPERIMENTAL

Cultivo de *Pestalotiopsis spp.*

Pestalotiopsis spp. fue crecido durante 10 días a 25°C en medio agar papa dextrosa. Al término de la incubación se recuperaron los conidios y se contaron en una cámara de Neubauer.

Nanopartículas de óxido de cobre

NPs de CuO fueron sintetizadas por reducción química, a continuación, se describe de manera breve la ruta de la síntesis. Se preparó una solución de 300ml de dihidrato de cloruro de cobre (II) ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, 99%) a 0.05M en agua Milli-Q, la solución se calienta hasta alcanza los 70°C bajo agitación magnética vigorosa. Cuando esta alcanza la temperatura, se agrega por goteo 100 mL de hidróxido de sodio (NaOH, Sigma Aldrich, 97%) a 0.80 M, el goteo se realiza a una velocidad de 20ml/min, en cuestión de minutos la solución cambiará de color hasta alcanzar un tono café oscuro, a partir de ese momento, la solución se mantendrá bajo agitación a 70 °C por 24 h. Se deja enfriar la solución de NPs y por centrifugación se procede a separar las NPs del sobrenadante, y se redispersan nuevamente con agua Milli-Q. El proceso de limpieza se repite en dos ocasiones más, finalmente el precipitado se coloca en un vaso de precipitados a 90 °C para evapora el agua sobrante. El tamaño promedio de NPs obtenido por microscopia electrónica (SEM) fue de 8 ± 3 nm.

Exposición de *Pestalotiopsis* spp a las CuO-NPs

En placas de 96 pozos se inocularon 1×10^5 conidios/mL en medio Marthur, adicionados con diluciones seriadas de CuO-NPs (0.0009 – 2 g/L). Conidios no expuestos a las CuO-NPs fueron utilizados como control. Las placas se incubaron a 25 °C hasta por 120 h. Cada 24 horas se analizó el efecto de las nanopartículas sobre la morfología, diferenciación y actividad metabólica mitocondrial del hongo.

Determinación de parámetros bioquímicos y morfológicos en *Pestalotiopsis* spp

Posterior a la exposición de *Pestalotiopsis* spp frente a CuO-NPs, se determinó la actividad metabólica mitocondrial mediante el ensayo de XTT. Para ello, se adicionaron 100 μL de una solución de 0.25 mg/mL XTT a cada pozo y se incubó la placa a 25°C por 90 minutos. Al término de la incubación se cuantificó el formazan determinando la absorbancia a 490 nm (Espectrofotómetro Epoch BioTek). El efecto de las NPs sobre la diferenciación de conidios a micelio y la morfología de éste último fueron analizados por microscopía de campo claro (Microscopio invertido Primo Vert, Carl Zeiss) y epifluorescencia, después de realizar la tinción de las paredes celulares con el colorante blanco de Calcofluor, observando las muestras en un microscopio de epifluorescencia (Leica, DMLS) con el filtro B (450 – 490 nm) y registrando las imágenes con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss).

Determinación de la fitotoxicidad de CuO-NPs en plántulas de *V. corymbosum*

Plántulas de arándano azul de 8 meses de edad, crecidas en medio Murashige & Skoog, fueron expuestas a dos concentraciones (0.125 y 2 g/L) de CuO-NPs en medio Hoagland durante 7 días, con ciclos de luz/oscuridad a 28°C (Cámara Bioclimática Biotronette Mark III, Lab-Line). Plántulas no expuestas fueron usadas como control. Después de la incubación de las plántulas con las CuO-NPs, se determinó en sus zonas apical, media y basal, el contenido relativo de la clorofila utilizando el medidor de clorofila SPAD-502. Además, se determinó la longitud del tallo y raíz de cada plántula.

RESULTADOS

Pestalotiopsis spp

En cultivos de *V. corymbosum* (arándano azul) ubicados en el estado de Jalisco, se realizó el aislamiento de *Pestalotiopsis* spp a partir de plantas que presentaban signos como clorosis, marchitez, caída anticipada de hojas y sectores de la planta con sintomatología unilateral (Fig. 1A). Los cultivos axénicos del hongo recuperado muestran colonias de *Pestalotiopsis* spp con producción de micelio denso, de un aspecto algodonoso, con crecimiento radial que cubre la totalidad de la placa (lado frontal) y la presencia de sus acérvulos característicos (observados como puntos de color negro y de consistencia dura) (Fig. 1B). Los conidios del hongo son fusiformes, con características versicolor y algunas partes negras y otras hialinas (Fig. 1C). Además, presentan de tres a cuatro apéndices apicales y uno basal los cuales se observan claramente teñidos con blanco de Calcoflúor (Fig. 1D y E).

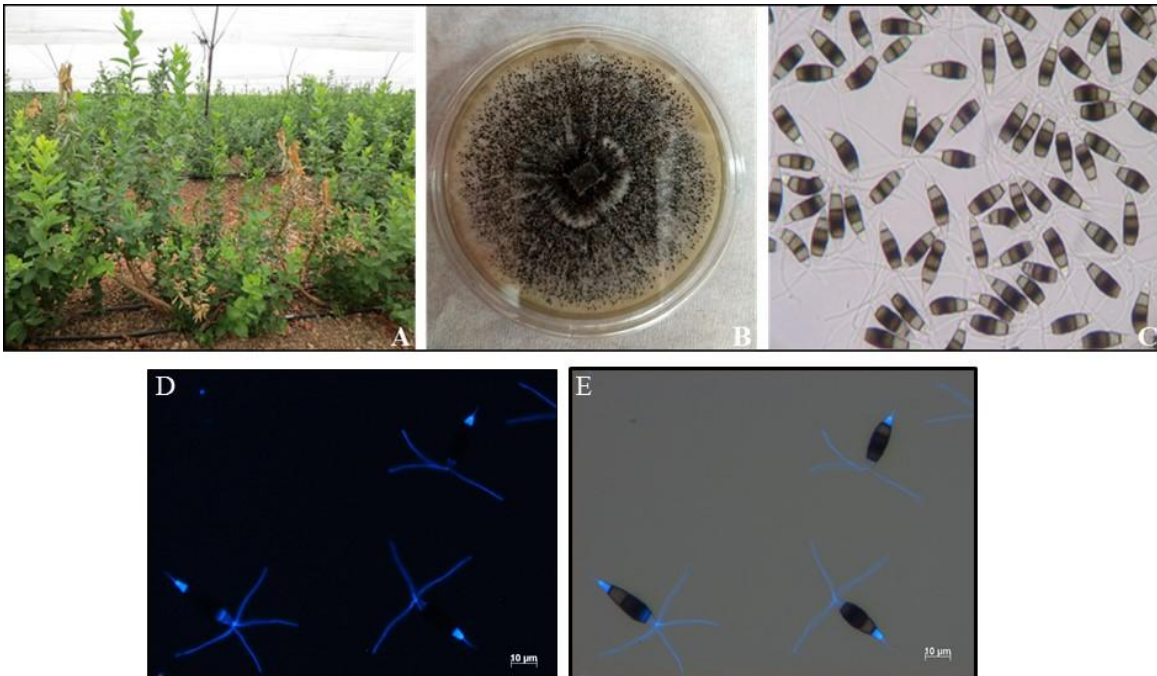


Figura 1. Morfología de *Pestalotiopsis spp.* A) plantas de arándano con signos característicos de la enfermedad; B) cultivo axénico de *Pestalotiopsis spp.*; C) conidios de *Pestalotiopsis spp.* en microscopía de campo claro; D y E) conidios teñidos con blanco de Calcofluor.

Determinación de la actividad metabólica mitocondrial de *Pestalotiopsis spp.* expuesto a CuO-NPs. La actividad metabólica mitocondrial, determinada a las 24 y 48 h de exposición del hongo a las CuO-NPs, presenta un ligero aumento cuando el hongo estuvo expuesto a las concentraciones de 9.7×10^{-4} – 3.9×10^{-3} g/L (Fig.2). Sin embargo, con concentraciones de NPs mayores o iguales a 7.8×10^{-3} g/L se observó una marcada disminución en la actividad metabólica mitocondrial, independiente del tiempo de exposición, siendo más evidente éste efecto a las 72 h. Después de 72 h de cultivo en presencia o ausencia de NPs, se observó una disminución de la actividad metabólica, independientemente de la concentración de CuO-NPs, indicando que el hongo alcanzó su fase estacionaria y por lo tanto la reducción de su metabolismo.

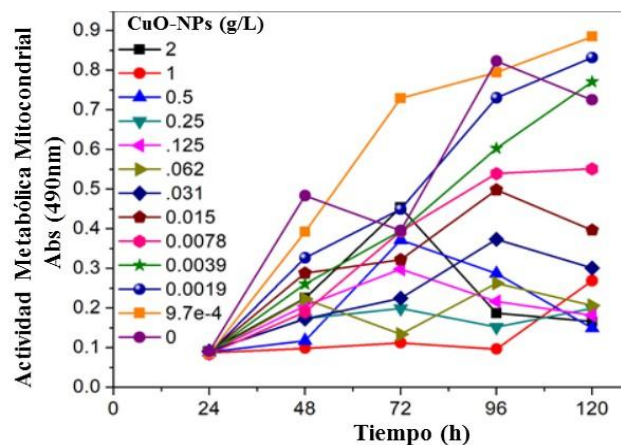


Figura 2. Actividad metabólica mitocondrial de *Pestalotiopsis spp.* expuesto a diferentes concentraciones de CuO-NPs

Análisis de la diferenciación y morfología de *Pestalotiopsis* spp expuesto a CuO-NPs

La tinción con blanco de Calcoflúor de las células recuperadas de los cultivos de *Pestalotiopsis* spp después de 72 h de exposición con las CuO-NPs, permitió ver la localización de la quitina en la pared celular del hongo. Como se observa (Fig. 3A) en los cultivos no expuestos a las nanopartículas (Fig. 3A), la masa micelial presenta hifas septadas claramente distinguibles por la tinción. Cuando el hongo se expuso a concentración de 3.1×10^{-2} a 9.7×10^{-4} g/L de CuO-NPs (Fig. 3B), se observó la fluorescencia en la pared celular de las hifas y septos, pero con acumulaciones evidentes de quitina (revelada por el colorante) en algunas zonas (Fig. 3B flechas). En el rango de concentración de 6.2×10^{-2} a 0.25 g/L de CuO-NPs, la acumulación de la sonda es más evidente (Fig. 3C flecha), sugiriendo por la morfología de las estructuras, la formación de artrosporas. En contraste, cuando se usaron concentraciones de 0.5 a 2 g/L de CuO-NPs no se observó la germinación de los conidios y consecuentemente no hay formación de micelio (Fig. 3D). Con base en estos resultados, se sugiere que las alteraciones en la morfología de *Pestalotiopsis* spp ocasionadas por su interacción con CuO-NPs, son debidas, entre otras, a cambios en la síntesis de la pared celular del hongo (alteraciones en el flujo de vesículas, cambios en las sintasas correspondientes, etc.) que llegan a ocasionar la formación de estructuras de resistencia (artrosporas) y la falla en la germinación de los conidios.

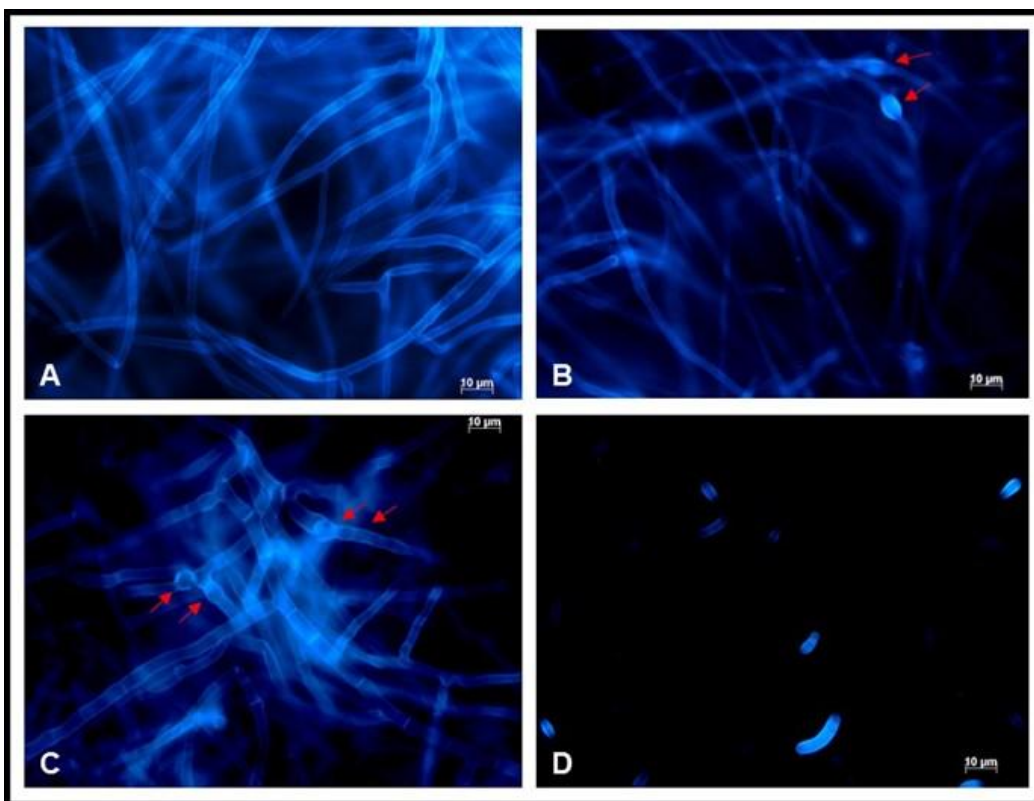


Figura 3. Análisis de la diferenciación y morfología de *Pestalotiopsis* spp expuesto a CuO-NPs por 72 h. Alícuotas de los cultivos fueron teñidas con blanco de Calcoflúor y observadas en el microscopio de epifluorescencia. Las imágenes son representativas de los cultivos recuperados después de la interacción de los hongos con diferentes concentraciones de nanopartículas: A) Control (cultivo no expuesto a nanopartículas); B) cultivo expuesto a 3.1×10^{-2} a 9.7×10^{-4} g/L de CuO-NPs; C) cultivo expuesto a 6.2×10^{-2} a 0.25 g/L de CuO-NPs; D) cultivos expuestos a 0.5 a 2 g/L de CuO-NPs.

Análisis del contenido de clorofila en las plántulas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano azul) expuestas a CuO-NPs

Se determinó el contenido de clorofila en tres zonas de la plántula: apical, media y basal, tanto de las que fueron expuestas a concentraciones de 0.125 y 2 g/L de CuO-NPs, como de las plántulas no expuestas a CuO-NPs (Fig. 4). El análisis estadístico utilizando el método de Tukey, indicó que los tres grupos (plántulas no expuestas y expuestas a las 2 concentraciones de nanopartículas) pertenecen a la misma agrupación, es decir, no hay una diferencia significativa de los resultados del contenido de clorofila en los tres grupos de tratamiento, independientemente de la concentración de CuO-NPs usada (Tabla 1), sugiriendo que las CuO-NPs no afectan el contenido de clorofila de las plántulas y con ello la fotosíntesis en las plántulas de *Vaccinium corymbosum*.

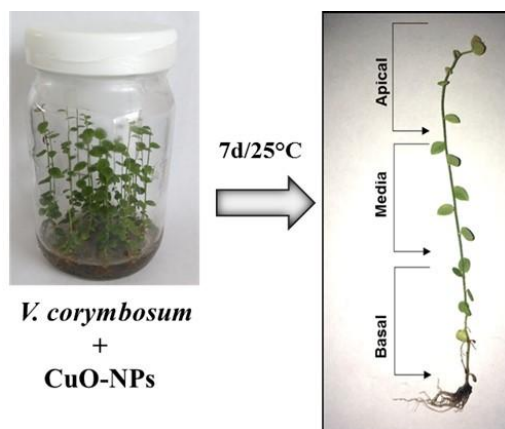


Figura 4. Determinación de las zonas de la plántula de *Vaccinium corymbosum* expuestas a CuO-NPs para la cuantificación de la clorofila.

Tabla 1. Contenido de clorofila por zonas en plántulas de *Vaccinium corymbosum*

CuO-NPs (g/L)	Contenido de clorofila por zonas de la plántula (Unidades SPAD)		
	Basal	Media	Apical
0	20.3296 ^a	21.4444 ^a	16.9185 ^a
0.125	18.2703 ^a	20.6111 ^a	22.0185 ^a
2	25.0814 ^a	24.9333 ^a	19.4444 ^a

Determinación de la longitud del tallo y raíz de plántulas de *Vaccinium corymbosum* (arándano azul) expuestas a CuO-NPs

Se midió la longitud del tallo y la raíz en las plántulas utilizadas en el ensayo, determinándose una longitud promedio de 7.99 y 2.63 cm en el tallo y la raíz respectivamente, cuando las plántulas no se expusieron a CuO-NPs. En los dos grupos de plántulas expuestas a CuO-NPs (0.125 y 2 g/L) se obtuvo un promedio en la longitud del tallo de 8.42 y 7.96 cm respectivamente; y en la longitud de la raíz de 2.68 cm en las plántulas expuestas a una u otra concentración de nanopartículas. El análisis estadístico utilizando el método de Tukey (n=87, *p≤ 0.05), indicó que no existe una diferencia significativa en la longitud del tallo y raíz de las plántulas de arándano azul, independientemente de la concentración de CuO-NPs a las que fueron expuestas (Tabla 2).

Tabla 2. Determinación de la longitud del tallo y raíz de plántulas de *Vaccinium corymbosum*

CuO-NPs (g/L)	Tallo (cm)	Raíz (cm)
0	7.99 ± 3.26 ^a	2.63 ± 1.19 ^a
0.125	8.42 ± 2.78 ^a	2.68 ± 1.13 ^a
2	7.96 ± 2.31 ^a	2.68 ± 1.21 ^a

CONCLUSIONES

La actividad antifúngica de las CuO-NPs en *Pestalotiopsis spp* es dependiente del tiempo de interacción y la concentración de nanopartículas presentes ocasionando cambios morfológicos y ausencia de germinación de los conidios. Si bien, estas nanopartículas son tóxicas para el parásito, no se observó un efecto fitotóxico en plántulas de *V. corymbosum* a las concentraciones empleadas en el presente ensayo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Ing. Agrónomo Violeta Aspeitia Echegaray (Especialistas en papayas S. A. de C.V.) por la donación de las plántulas de arándano. A la Ing. Bioquímico Teresa Vianey Jiménez Ramírez y M en C. Sanjuana Sánchez Ramos por su participación en la determinación del efecto fitotóxico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Luan Y.S., Shang Z.T., Su Q. First Report of a *Pestalotiopsis spp*. Causing Leaf Spot of Blueberry in China, Plant Disease, Vol. 92, 2008, pp. 171.
2. Espinoza J.G., Briceño E.X. & Latorre BA. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis spp* and a *Truncatella sp.* in Chile. Plant Disease, Vol. 92, 2008, pp. 1407–1414.
3. Shende S., Avinash P & Rai M. (2015). Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idlimbu) juice and its antimicrobial activity. World J Microbiol Biotechnol., Vol. 31, 2015, pp. 865–873.

OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO *ASPERGILLUS ORYZAE* UV01 PARA LA PRODUCCIÓN DE AMILASAS.

Pucheta Pacheco, J.J.¹Sánchez-Otero, M. G.¹, Torres-Palacios, C.¹, Oliart-Ros, R.M.², Ruiz-López, I.I.³, Quintana-Castro, R.¹

¹Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana, roquintana@uv.mx ²Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz. ³Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

RESUMEN

Las enzimas obtenidas de hongos son comúnmente empleadas a nivel industrial y en aplicaciones biotecnológicas; entre estas, se encuentra el uso de α -amilasas para la hidrólisis del almidón y su modificación en la industria alimentaria.¹ Estas enzimas escinden la molécula de almidón en fracciones más cortas, actuando directamente sobre los enlaces α -1,4 dando origen a moléculas pequeñas como maltotriosa, maltotetraosa o maltopentosa. *Aspergillus oryzae* UV01 es un hongo filamentosos hialino, saprofito y pertenece al *phylum Ascomycota*.¹ *A. oryzae* UV01 ha demostrado ser productor de enzimas hidrolíticas; principalmente las enzimas amilolíticas AmyA y AmyB en presencia de moléculas inductoras.² Con el fin de caracterizar a las enzimas, los cultivo pueden optimizarse a través del uso de estrategias estadísticas como el uso de Diseños Factoriales Fraccionados y de Superficie de respuesta y así obtener concentraciones enzimáticas mayores.³ En el presente trabajo se propuso un modelo experimental fraccionado con cuatro variables: temperatura, pH y concentración de almidón en medio inductor, cultivado durante 7 días, esta última variable solo se utilizó para poder realizar la parte estadística.³ El punto de producción máxima que se obtuvo a partir del diseño fue la condición con temperatura a 45 °C, concentración de almidón de 10 mg/mL y pH de 4.0 al día 5.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que catalizan todas las reacciones bioquímicas y biológicas y son empleadas comúnmente en el área de la biotecnología, alimentaria, farmacéutica e Industrial. Existen diversos tipos de enzimas entre las más utilizadas para la clarificación de jugos, en procesos biotecnológicos, y en procedimientos de Biología Molecular. son: oxidorreductasas, ligasas, transferasas, hidrolasas.⁴

Tabla 1. Clasificación de las enzimas

Tipo	Función	Ejemplo
Oxidorreductasas	Transferir electrones a una molécula.	Las oxidasas catalizan la oxidación de glucosa a ácido glucónico.
Ligasas	Unir moléculas mediante enlaces covalentes acompañado de hidrolisis en la reacción.	Las DNA ligasas unen los enlaces fosfodiéster covalentes.
Transferasas	Catalizar la transferencia de un grupo de una sustancia a otra.	El DNA metiltransferasa cataliza la transferencia de uno o más metilos al DNA.
Hidrolasas	Romper las biomoléculas con moléculas de agua.	Las amilasas, rompen los enlaces glucosídicos α -1,4 de la cadena de almidón.

Existen diversos microorganismos que son productores de enzimas amilolíticas, entre ellos se encuentran los miembros del género *Aspergillus*, en general son hongos filamentosos hialinos y saprofitos pertenecientes al *phylum Ascomycota*, entre ellos, las especies productoras de amilasas más estudiadas son: *Aspergillus nigger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*. Es importante mencionar que estas especies pueden ser patógenos en los casos de personas inmunocomprometidas y se ha demostrado que su prolongada exposición a las esporas puede provocar un daño nefrotóxico.⁵

La especie *Aspergillus oryzae* fue aislada a partir de la semilla de arroz por Alhburg Cohn en 1884 y se utiliza en la cultura del Asia oriental para la producción del *Sake* que es un vino hecho a base de arroz por el cual pasa un proceso de fermentación consecuente a las enzimas hidrolíticas como las amilasas y las lipasas.⁶

Las amilasas de esta especie se caracterizan por ser enzimas intracelulares como α -amilasas, Sus temperaturas óptimas varía desde los 25°C hasta los 50°C esto adecuándose al tipo de biorreactor, las amilasas realizan sus hidrólisis en soluciones alcalinas, neutras y acidas.

La producción industrial de las α -amilasas han sido altamente procesadas actualmente ya que su utilización es empleada en la hidrólisis selectiva y enlaces glucosídicos. Por ello la inmovilización de esta enzima, optimizarla y producirla en mayor volumen es necesaria a nivel industrial alimentario puesto que es una enzima endógena que rompe las cadenas α -1,4 de la cadena de almidón dejando dextrina (cadenas de glucosa cortas). Por ello la optimización de esta enzima se llevó a cabo para poder generar el punto máximo de producción amilolítica de *Aspergillus oryzae* UV01.

Los diseños experimentales estadísticos son una opción adecuada para poder optimizar recursos, tiempo y los factores incluidos en el mismo experimento debido a que se puede diseñar un modelo estadístico experimental fraccionado de dos niveles y calcularla con ecuaciones y estadística.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue el optimizar la producción de enzimas amilolíticas producidas por *Aspergillus oryzae* mediante diseños estadísticos de experimentos

MATERIALES Y METODOS

- Reactivación de la cepa *Aspergillus oryzae* UV01.

La reactivación de la cepa de *Aspergillus oryzae* UV01 se realizó en medio PDA sólido (Agar Papa Dextrosa a una temperatura de 37° C durante tres días.

- Prueba de hidrólisis de almidón del hongo *Aspergillus oryzae* UV01.

Una vez reactivado el hongo, éste se utilizó para hacer la prueba de hidrólisis de almidón que se llevó a cabo en un medio sólido que contenía PDA (Agar Papa Dextrosa) con un 0.4 g de almidón por cada 100 mL de medio para demostrar la hidrólisis y que al término de la incubación que se cultivó en tres días se colocaron unas gotas de Lugol para poder observar un aro transparente alrededor de la colonia, esto se considera prueba positiva de producción de amilasas.⁷

- Estandarización del inóculo para el medio inductor.

Con el fin de inocular en cada prueba experimental, la misma concentración de esporas, se realizó una cuantificación y preparación de alícuotas de la siguiente forma:

Se colocó 1 mL de agua destilada en la caja Petri con medio PDA donde se cultivó previamente el hongo por tres días, una vez colocada, se agitó suavemente con el fin de recolectar la mayor cantidad de esporas posibles y se recuperó y se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se llevó a un volumen final de 25 mL, posteriormente se homogeneizó suavemente por inversión. Para su cuantificación en cámara de Neubauer , 30 \square L de la solución anterior, se usaron para teñir con 20 \square I azul de lactofenol.

El total de esporas se calculó con la Ecuación 1:

$$N^{\circ} \text{ de Esporas} = \frac{n^{\circ} \text{ de esporas en total}}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes}} \times 10,000 \quad (1)$$

Diseño estadístico Experimental

Con el fin de encontrar las condiciones experimentales óptimas para la producción de amilasa por *Aspergillus oryzae* UV01. Se propuso explorar inicialmente tres variables en dos niveles en un diseño estadístico experimental de tipo factorial fraccionado de acuerdo a lo que se indica en la tabla 2 (Diseño experimental fraccionado), donde se muestran los valores codificados para cada variable.

Tabla. 2 Diseño experimental factorial fraccionado

Condición	X1(°C)	X2(pH)	X3 (almidón %p/v)
1	(-1)25	(-1)4	(-1)1
2	(+1)45	(-1)4	(-1)1
3	(-1)25	(+1)8	(-1)1
4	(+1)45	(+1)8	(-1)1
5	(-1)25	(-1)4	(+1)5
6	(+1)45	(-1)4	(+1)5
7	(-1)25	(+1)8	(+1)5
8	(+1)45	(+1)8	(+1)5

Cada condición fue ensayada por duplicado y la medición de actividad amilolítica se llevó a cabo durante un periodo de siete días, por lo que el tiempo fue considerada una cuarta variable para los cálculos finales.⁽³⁾

Inducción de la producción de amilasas

Una alícuota de esporas previamente preparada a una concentración de 1% esto quiere decir 6×10^7 en $250 \mu\text{l}$ de *Aspergillus oryzae* UV01 fue inoculada en 100 mL de medio inductor de producción de amilasas, que fue preparado de acuerdo con la siguiente composición. (Tabla 3):

Tabla 3 Preparación de Medio Inductor

Ingrediente	Concentración
Almidón soluble	1.0-5.0 %*
K_2HPO_4	0.5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/L
NaCl	0.5 g/L
FeSO_4	0.01 g/L
NO_3^-	1 g/L

* Según la corrida experimental.

Una vez inoculado, se sometió a agitación orbital (120 rpm), durante el tiempo de cultivo.⁸

Medición de la actividad amilolítica

Con el fin de evaluar la actividad amilolítica se utilizó la técnica de la medición de azúcares reductores con DNS, para ello, se obtuvo el extracto crudo, filtrando una alícuota del medio de cultivo a través una membrana de nitrocelulosa con corte de $25 \mu\text{m}$, el filtrado libre de restos celulares se llamó Extracto Crudo, éste se sometió al ensayo de azúcares reductores de la siguiente forma: En tubos de ensayo de 15X175 se pipeteo $250 \mu\text{l}$ de Buffer de fosfatos 0.5 M, $250 \mu\text{l}$ de extracto crudo, 2 mL de DNS, se taparon los tubos con canicas por ser una reacción exotérmica. Se colocaron los tubos en agua hirviendo durante 5 minutos, y posteriormente se enfriaron los tubos en agua fría. Para calcular la concentración de azúcares reductores liberados por la actividad amilolítica presente en el medio se preparó una curva tipo de glucosa a partir de una solución con una concentración 1 mg/mL que se procesó de la misma forma. Una unidad de actividad se defina como la cantidad de enzima que libera 1 mg/mL de glucosa en las condiciones de ensayo.⁹

Ensayo para proteínas de Lowry

La medición de la concentración de proteínas es necesaria para calcular la actividad específica (U/mg de proteína).¹⁰ La determinación de proteínas por el método de Lowry se utilizó para la detección de grupos fenoles que conformaba parte de la proteína. Para ello el extracto crudo previamente filtrado en el paso anterior se procesó de la siguiente forma: en tubos de 13X75 se transfirieron $50 \mu\text{l}$ de extracto crudo, $50 \mu\text{l}$ de agua destilada y 1 mL de reactivo de Lowry, se agitó en vortex por 20 segundos, la muestra reposó por 10 minutos, y se agregaron $100 \mu\text{l}$ de Folin-

Ciocalteus, para posteriormente agitar en vortex 20 segundos y dejar reposar la muestra 20 minutos, hasta ser leída a 660nm en un Espectrofotómetro BioRad®. Para la curva de calibración del reactivo se utiliza Albumina sérica bovina (1mg/ml) con medición de absorbancia a 660 nm.

RESULTADOS

De acuerdo a la prueba de hidrólisis de almidón en medio sólido la cepa *Aspergillus oryzae* UV01 es productora de al menos una enzima con capacidad amilolítica (Figura 1).

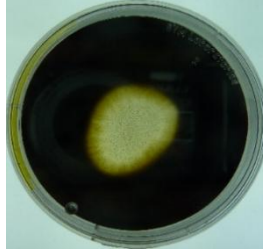


Figura 1. Prueba de Hidrolisis de Almidón con Yodo Lugol.

Una vez comprobada la capacidad amilolítica producida por la cepa *Aspergillus oryzae* UV01, se procedió a realizar las corridas experimentales de acuerdo con el diseño previamente mencionado (Figura. 2)

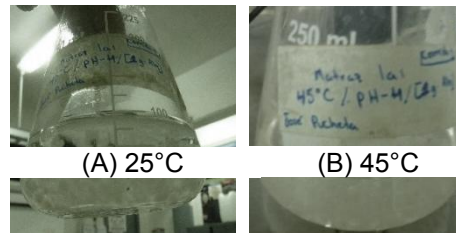


Figura 2. *Aspergillus oryzae* UV01 en medio inductor para la producción de amilasas en diferentes.

Ejemplo de los resultados de cada corrida experimental se muestran en las Figuras 2 (A) y (B) en donde se presenta la actividad volumétrica y en las diferentes corridas experimentales.

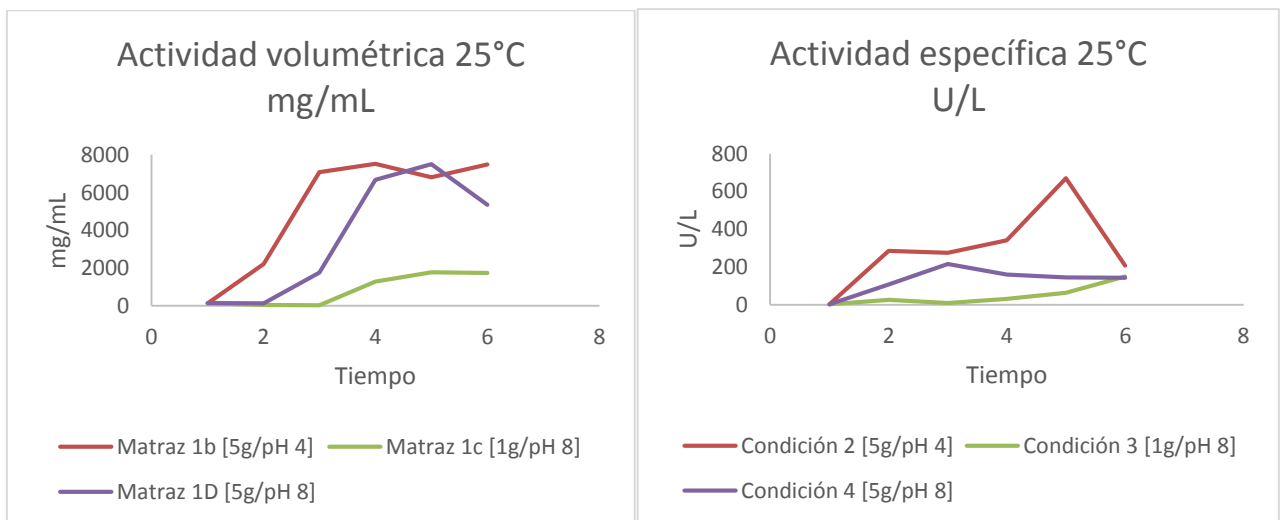


Figura 3. (A), Actividad volumétrica 25°C mg/mL

Figura 3. (B), Actividad específica 25°C U/L

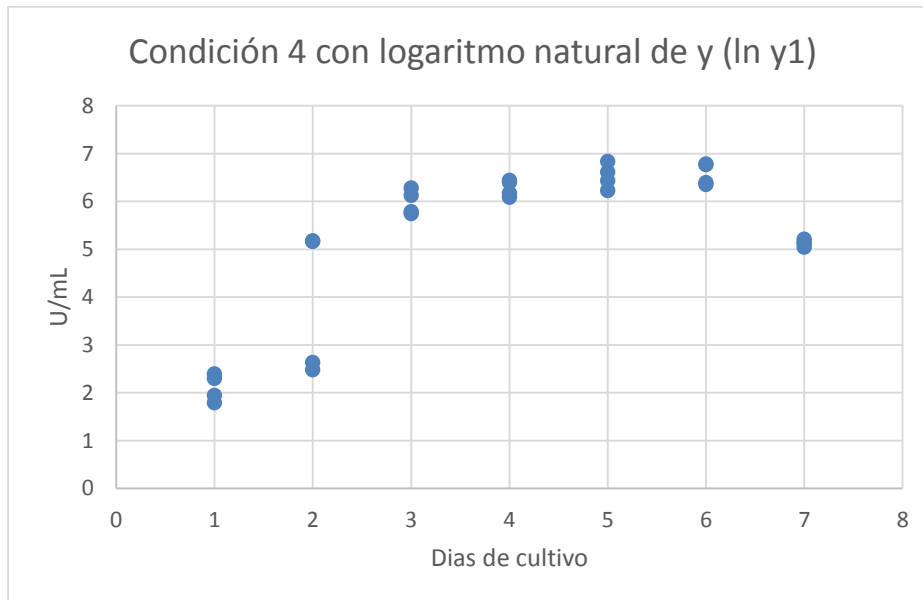
Estos resultados expresados como Actividad volumétrica (U/mL) así como en Actividad específica (U/mg) fueron sometidos a análisis de la siguiente forma: Se propuso el modelo mostrado de acuerdo con la Ecuación de la forma (2), ya que se consideró el tiempo (expresado en días) como una cuarta variable.

$$\ln y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_1 X_2 + \beta_6 X_1 X_3 + \beta_7 X_1 X_4 + \beta_8 X_2 X_3 + \beta_9 X_2 X_4 + \beta_{10} X_3 X_4 + \beta_{11} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 X_3 X_4 \text{ -----(2)}$$

El modelo propuesto fue sometido a regresión y los resultados de la regresión son los mostrados en la (Tabla 4).

Tabla 4 Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.960789
Coefficiente de determinación R ²	0.92311549
R ² ajustado	0.90069085
Error típico	0.223278
Observaciones	32

El coeficiente de determinación y los valores de la regresión manifiestan un buen ajuste al modelo, R Los resultados muestran que el máximo producido en las condiciones experimentales analizadas en el presente trabajo se encuentra en la condición 4 (45°C, un pH 4, y almidón 5%) a los 4 días de cultivo de acuerdo a la siguiente gráfica que muestra del modelo experimental



De acuerdo con esto, para posteriores estudios como la caracterización bioquímica, se cosechará el extracto crudo en las condiciones

DISCUSIÓN

De acuerdo con otros autores en un artículo de investigación (IJ Shah y colaboradores), propusieron en su modelo de optimización de α -amilasa producidas por el hongo *Aspergillus oryzae* que la condición más adecuada fue en un pH-7, 45°C al 4 día¹¹, como se podrá observar la única variable similar obtenida a en nuestro modelo experimental fue en temperatura a 45°C. La variación existente en las condiciones en la que el hongo produzca micelio para la producción de amilasas es que se

adapta al biorreactor para poder sobrevivir. La formación de micelio varía de acuerdo con las condiciones en el que se encuentre, esto quiere decir que el micelio puede crecer una forma filamentosa o formando biomasa y esto contrae variaciones entre otros autores.

CONCLUSIONES

La condición más adecuada de este modelo experimental fue la cuarta con las siguientes variables; (Temperatura de 45°C, pH-4, y la concentración de almidón (5 gr por 100 mL de medio inductor)). De las cuales se obtuvo mayor producción de Amilasas producidas por el hongo *Aspergillus oryzae* UV01

BIBLIOGRAFIA

1. Biotatálisis y Biotecnología, Miguel Arroyo, Isabel de la Mata, Universidad Complutense de Madrid, Vol.190, No 768, (2014). <http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/viewArticle/1958/2290>.
2. Enzimas amilolíticas microbianas, Fausto Arellano Carbajal, Jorge Olmo Soto, Biotecnología 117, 1999 vol. 4 #3. http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_1999_3/enzimas.pdf
3. Badillo-Zeferino, G.-L., Ruiz-López, I.-I., Oliart-Ros, R. and Sánchez-Otero, M.-G. (2017), Improved expression and immobilization of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermostable recombinant lipase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64: 62–69. doi:10.1002/bab.1444.
4. Enzimas, Universidad Autónoma de Guadalajara, Química II, <http://genesis.uag.mx/edmedia/material/quimicall/enzimas.cfm>.
5. *Aspergillus* spp, Instituto de seguridad de higiene en el trabajo, Data-Bio, 23 septiembre, (2012). <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Ficha%20Aspergillus%20spp.pdf>.
6. Enzyme Production and Growth of *Aspergillus oryzae* S. on Soybean Koji Fermentation, ChuenjitChancharoonpong Pao-ChuanHsieh Shyang-ChwenSheu, ELSEVIER, Vol. 2, 2012, pages 57-61. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212670812000826>.
7. Pruebas bioquímicas, Universidad Autónoma De México, departamento de química, http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c_PruebasBioquimicas_17548.PDF.
8. Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment, Shihui Wang, Chaoyang Lin, Yun Liu, Zhicheng Shen, Jenasia Jeyaseelan, Wensheng Qin, Junio 15, (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4913226/pdf/ijbmb0007-0001.pdf>.
9. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, GAIL LORENZ MILLER, Pioneering Research Division, Quarfermasfer Research and Engineering Center, Natick, Mass. VOL. 31, NO. 3, MARCH 1959.
10. Valoración de proteínas por el método de Lowry, Universidad de Alcalá, <http://www3.uah.es/bioquimica/Sancho/farmacia/practicas/Lowry.pdf>.
11. Optimization for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology, IJ Shah , PN Gami, R.M. Shukla, D.K. Acharya, *Basic Research Journals of microbiology*, Vol.1, 10 January 2014.

INCREMENTO DE LA INMUNIDAD PASIVA DEL BECERRO RECIÉN NACIDO POR EL USO DE CALOSTRO ENRIQUECIDO CON IGY

Sonia Vázquez-Flores, Ricardo Paredes-Parra, Juan Carlos Urquiza-Roiz, Alejandra Berenice Tovar García, Juan Ángel Zubiri-Suárez

Tecnológico de Monterrey-Querétaro svazquef@itesm.mx

RESUMEN

La inmunidad pasiva en el becerro recién nacido depende del calostro que ingiere en las primeras horas del nacimiento, la industria lechera está en constante búsqueda de formas complementarias y alternativas para proveer esta protección, dado que el becerro nace amaglobulinémico (Trotz-Williams et al., 2008). Las IgY constituyen esta alternativa, dado que pueden desarrollarse específicamente contra los patógenos virales y bacterianos que afectan más comúnmente al becerro (Cortese, 2009). El objetivo de este proyecto fue comparar tres tipos de inmunidad pasiva para identificar qué tratamiento provee el mayor número de IgG circulantes para protección inmunológica del recién nacido. El estudio incluyó 50 becerros desde el nacimiento, a los que se les administraron tres diferentes tratamientos en forma aleatoria: 1. Calostro natural (Testigo); 2. Calostro enriquecido con IgG (T1) y 3. Calostro enriquecido con IgY (T2). El calostro se cosechó por tres semanas, y se mezcló, congelándose en bolsas de 2 L, para ser suministrado solo o enriquecido según el grupo de estudio. El suero sanguíneo de cada becerro, se colectó a las 24 h de vida, analizándose con ELISA para determinación de IgG. No se encontraron diferencias estadísticas en la absorción de IgG. Si bien no se midieron las IgY circulantes, no se identifica una competencia en los sitios de absorción de IgG e IgY, lo que permite tener la ventaja de incorporar inmunoglobulinas específicas para control de patógenos de forma preventiva incrementando el espectro de inmunidad pasiva en el becerro neonato.

INTRODUCCIÓN

La inmunidad pasiva a través del calostro materno es fundamental para la salud y supervivencia del ternero en las primeras semanas de vida, y a largo plazo para una eficiente producción láctea. La cría bovina presenta una condición de agamaglobulinemia a nacimiento, por el tipo de placentación sindesmocorial (Wooding et al., 1994). El calostro, es la principal fuente inmunitaria contra patógenos, su consumo no solo suministra inmunoglobulinas. El primer producto de la glándula mamaria de los bovinos después del parto, también contiene factores de crecimiento, linfocitos y nutrientes de primera calidad. Los factores de crecimiento actúan como promotores de desarrollo de las vellosidades intestinales del neonato (Xu, 2014).

El tiempo en el cual se alimenta el calostro a la cría recién nacida es de importancia vital para una absorción eficiente. Durante las primeras horas de vida, la permeabilidad intestinal para los receptores FcR permite que las macromoléculas tales como las inmunoglobulinas, puedan llegar a torrente sanguíneo en cuanto llegan al duodeno (Baumrucker, 2010). El calostro está representado por IgG₁ la cual constituye el 80%, las IgG₂ el 7%, IgA alcanza el 8% y la IgM solamente representa el 5% del total (Butler, 1995; Besser et al., 1985).

Se recomienda suministrar a la becerro el 10% de su peso corporal en las primeras dos a cuatro horas del nacimiento, para que posteriormente ofrecerle otra toma del 4-5% de su peso antes de las 12 horas de vida (Vázquez-Flores et al., 2018). La eficiencia en la absorción está determinada por la calidad inmunológica, microbiológica, así como el suministro eficiente del calostro, de preferencia en biberón (Quigley et al., 2002). Menos del 40% de las becerras en EUA presentan la cantidad mínima de IgG/ml en suero sanguíneo a las 48 h del nacimiento, esto se conoce como falla en la inmunidad pasiva, lo que constituye por sí mismo un 3.2% de mortalidad (Health Inspection Service, 1993; Tyler et al., 1999). Aquellos becerros que no reciben calostro tienen 74 veces más probabilidades de morir que un becerro que consume alguna cantidad. La mortalidad según Wells y cols., se puede disminuir en 31% en las primeras tres semanas de vida de la becerro, con ofrecer 2.5 L calostro en menos de 4 horas postparto (Wells et al., 1996).

TEORÍA

Diarrea como complejo sindrómico en neonatos

Una de los complejos sindrómicos más relevantes en los bovinos recién nacidos es el causando por las diarreas neonatales, la cual se considera que es la principal causa de morbilidad y mortalidad en becerros (Vázquez Flores, S et al., 2018). El estándar de oro actuales determinados por la DCHA en 2016, indican que no debería de haber más del 15% de becerras con diarrea. Las diarreas son multifactoriales, con diferentes tipos de patógenos asociados, con distintos daños histopatológicos en las vellosidades intestinales. La estrategia actual de control de enfermedades como *Cryptosporidium parvum*, *E. coli* K99, Rotavirus y Coronavirus, se basa en un control de vacunación a la madre, de tal manera que esta inmunidad pasiva sea transferida vía calostro. Aunque este tipo de tratamientos reduce la severidad de la diarrea, no la erradica (Parreño et al., 2010). Actualmente, el proceso de inmunización pasiva usando inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo de gallina (IgY's) se ha propuesto como una alternativa para el tratamiento y control de la diarrea en animales. Existen diferencias entre las IgY aviares y las IgG de los mamíferos: las IgY no se enlazan con proteínas A o G, las inmunoglobulinas no interfieren con las IgG en pruebas serológicas y no activan el complemento mamífero (Vega et al., 2011). El funcionamiento de este tipo de inmunidad, es mediante la inmunización de gallinas con patógenos, respondiendo con la producción de antígenos específicos para el patógeno con el que fueron infectadas (Carlander, 2000). El aislamiento de las IgY es muy simple y se pueden obtener hasta 25mg de IgY por yema de huevo, siendo del 2-10% antígenos específicos contra los patógenos por medio de hiper-inmunización de las aves. Existen diferencias entre las IgY aviares y las IgG de los mamíferos: las IgY no se enlazan con proteínas A o G, las inmunoglobulinas no interfieren con las IgG en pruebas serológicas y no activan el complemento mamífero (Vega et al., 2011).

Según los experimentos dirigidos por Vega et al. en el caso de Rotavirus y, Lee et al. en el caso de *Salmonella*; la IgY es determinante para disminuir las incidencias de BVR y de *Salmonella* respectivamente, en becerros neonatos (Lee et al. 2002; Vega et al. 2011). Sin embargo, Pérez no encontró valores estadísticamente significativos, que demostraran que la IgY tuviera efectos positivos en la salud animal, ni en ningún parámetro zootécnico (peso y estatura a destete) (Pérez, 2015). Además, en bovinos ha sido demostrada su efectividad contra patógenos como rotavirus, coronavirus, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Salmonella* spp y, en años recientes contra enfermedades causadas por protozoarios (*Eimeria*) presentándose así, como una alternativa prometedora contra *C parvum*. A pesar de lo anterior, aún no existen evidencias científicas concluyentes para su uso como una alternativa al tratamiento convencional (Diraviyam et al., 2014). Una vez que se pierde la homeostasis intestinal, una de las complicaciones es la pérdida neta de líquidos y de iones de sodio, bicarbonato, cloro y potasio. La pérdida de líquidos corporales puede llegar a ser de hasta 100ml/kg de peso en las primeras horas de vida dando como resultado diferentes grados de deshidratación, hipovolemia, acidosis metabólica e hipocloremia (Quigley, 2012).

Sistemas de prevención inmunológica de diarreas

Los animales afectados generalmente reciben terapia para la pérdida de fluidos, así como electrolitos y antibióticos para el tratamiento de enfermedades secundarias. La estrategia actual de control de patógenos como rotavirus, se basan en un control de vacunación a la madre, de tal manera que esta inmunidad sea transferida vía calostro con IgG contra el virus, la falta de eficiencia del sistema radica en que generalmente este rotavirus vacunal para el grupo A, sin embargo, se ha detectado una gran variedad antigénica caracterizados como N y G, que no necesariamente coinciden con la variedad vacunal (Rao et al., 2000). La suplementación de calostro con IgG específicas contra rotavirus permite reducir la severidad de la diarrea, no lo erradica (Parreño et al., 2010). La falla de inmunidad pasiva a un nivel menor de 5.2 g/dL tiene mayor relación con la presencia de problemas respiratorios, por lo que la suplementación de calostro con IgG reduce la presencia de estos problemas después de las 5 semanas de edad (Windeyer et al., 2014).

Otro método estudiado es la adición de calostro inmunizado, el cual, según Parreño et al. tiene un efecto estadísticamente positivo para controlar Rotavirus en neonatos, causado por una elevación de IgA ASC y una mayor diversificación de los isotipos en la mucosa intestinal (Parreño et al., 2010). El suplemento de calostro y el reemplazo de calostro, se diferencian, únicamente por la cantidad de IgG que contiene cada uno. El primero contiene una cantidad menos a 100 g de IgG, el segundo

contiene una cantidad mayor a los 100g de IgG. En el estudio de Quigley, et al (2002), se concluye que tanto el suplemento como el reemplazo, son absorbidos correctamente por los recién nacidos. En este mismo artículo se recomienda que el neonato ingiera entre 150 y 200 gr de IgG dentro de sus primeras 24 horas de vida para garantizar la transferencia pasiva de la inmunidad (Quigley, et al 2002).

Justificación del estudio

La tendencia actual es proveer al becerro recién nacido la mejor inmunidad posible, por lo que el presente estudio revisa tres alternativas, el consumo de calostro de vacas multíparas, el calostro suplementado con calostro liofilizado y el calostro suplementado con IgY específicas. La ingestión de IgY no interfiere con la absorción de IgG en becerros neonatos comparando con el mismo calostro natural, o el mismo calostro natural suplementado con IgG. Se requiere cuantificar el nivel de control del enteropatógeno de mayor importancia en esta producción pecuaria, el protozoario *Cryptosporidium parvum* cuya prevalencia es del 100% en becerras menores a tres semanas de edad y que es letal en el 15% de las crías.

Objetivos

Demostrar que la ingestión del suplemento de IgY en becerros neonatos al nacimiento no interfiere en la absorción de IgG de calostro natural a las 24 horas de vida.

Comprobar que agregar IgG al calostro natural permite aumentar la inmunidad pasiva para el control de *Cryptosporidium parvum*, un patógeno de alta prevalencia en el sitio de estudio.

Comprobar que agregar IgY al calostro natural permite aumentar la inmunidad pasiva para el control de *Cryptosporidium parvum*, un patógeno de alta prevalencia en el sitio de estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

Sitio de estudio

El estudio se realizó en el estado de Querétaro, en una producción lechera de 800 vacas lecheras, donde se crían hembras y machos Holstein y F1 con razas como Jersey, Suizas y Angus. El clima en los meses de junio a septiembre de 2017, cuando se llevó al cabo el estudio fluctuaron entre máximas de 32.5 y 16.5 °C. Siendo los meses más calurosos del año, representan el periodo de mayor reto para control de enteropatógenos.

Colección de calostro

Se colectaron 100 litros de calostro paulatinamente en un periodo de 3 meses congelando el mismo para evitar el crecimiento microbiano. Una vez que se obtuvo el total del calostro, se reunió para hacer un calostro compuesto, y se dividió en bolsas de 2 L hasta su uso. A este calostro compuesto se le denominará calostro natural.

Animales en estudio

Se seleccionaron aleatoriamente 50 becerros recién nacidos hembras o machos de raza Holstein. Se les asignaron uno de los siguientes tratamientos:

- 1) Grupo de calostro natural: 10 becerros recibieron 2 litros en su primera toma.
- 2) Grupo calostro natural adicionado de 50 g de calostro liofilizado.
- 3) Grupo calostro natural adicionado con IgY (producto comercial).

Muestreo de calostro, sanguíneo y fecal

Monitoreo de Calostro

Se tomaron tres muestras de calostro de 5 ml por cada tratamiento y se congelaron de inmediato a -20°C.

Toma de Muestra Sanguínea

A las 24 h de la toma de calostro, se tomaron muestra sanguíneas en tubo vacutainer. Se permitió que se hiciera el coágulo sanguíneo a temperatura ambiente y se colectó el suero sanguíneo. Las muestras se congelaron a -20°C en un tubos Eppendorf para ser analizadas en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular.

Diagnóstico de IgG

Se hicieron análisis por medio de refractometría por el sistema Brix de los calostros y sueros sanguíneos. Los calostros congelados serán analizados en laboratorio por el sistema de determinación de IgG Bovina por ELISA (Laboratorios Bethyl).

Diagnóstico parasitológico

Los análisis de laboratorio se realizarán en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Departamento Regional de Bio-ingeniería, del Tecnológico de Monterrey campus Querétaro.

Las muestras se llevaron en refrigeración en guantes, y se colocaron en frascos identificados con el número de muestra, día de muestreo y fecha de muestreo.

Diagnóstico de Cryptosporidium spp.

1. Días de muestreo de excretas: 0,7,10,14 y 21 días de edad como se muestra en a figura 1.
2. Se etiquetaron las muestras con número del becerro, grupo de tratamiento y fecha.
3. Las muestra fecales se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta llevarlas al laboratorio de Diagnóstico Molecular, donde se almacenaron hasta su análisis
4. Se realizaron pruebas parasitológicas morfológicas y de cuantificación de los oocistos de *Cryptosporidium parvum* (Tabla 1).

Tabla 1. Muestreo secuenciado fecal de los becerros en tratamiento

0	7	14	21	22
Muestreo fecal, obtenido directamente del recto del animal. - Refrigerar inmediatamente	Muestreo fecal, obtenido directamente del recto del animal. - Refrigerar inmediatamente	Muestreo fecal, obtenido directamente del recto del animal. - Refrigerar inmediatamente	Muestreo fecal, obtenido directamente del recto del animal. - Refrigerar inmediatamente	Llevar muestras al laboratorio

Diagnóstico morfológico

Para el análisis morfológico se hicieron frotis en un sólo portaobjetos con hisopo de cada una de las muestras por becerro en estudio. La lectura se realizará por muestra al microscopio óptico con aumento al 40x.

Análisis estadísticos

Se realizaron las bases de datos con los resultados de inmunidad pasiva, calostrometría, y resultados coproparasitológicos. El análisis estadístico se realizó con el software JMP 13.1.0, número de serie QVNJ0B0JJ7. Las pruebas realizadas fueron análisis demográficos, medias y desviaciones estándar, pruebas paramétricas de T-de Student y Hsu's MCB, y regresión lineal.

RESULTADOS

Se analizaron 36 hembras y 16 machos, agregándose 2 becerros mas al estudio porque dos becerros murieron durante la primera semana de vida. Las hembras presentaron pesos de 32.2 ± 4.32 Kg, mientras que los machos de 40 ± 5.3 Kg, siendo estadísticamente diferentes (Valor $p = 0.05$) por medio de la prueba T de Student. Esto indica que los 2 litros de calostro ofrecidos como primera toma, cubrían escasamente el 5% de peso vivo en inmunidad pasiva.

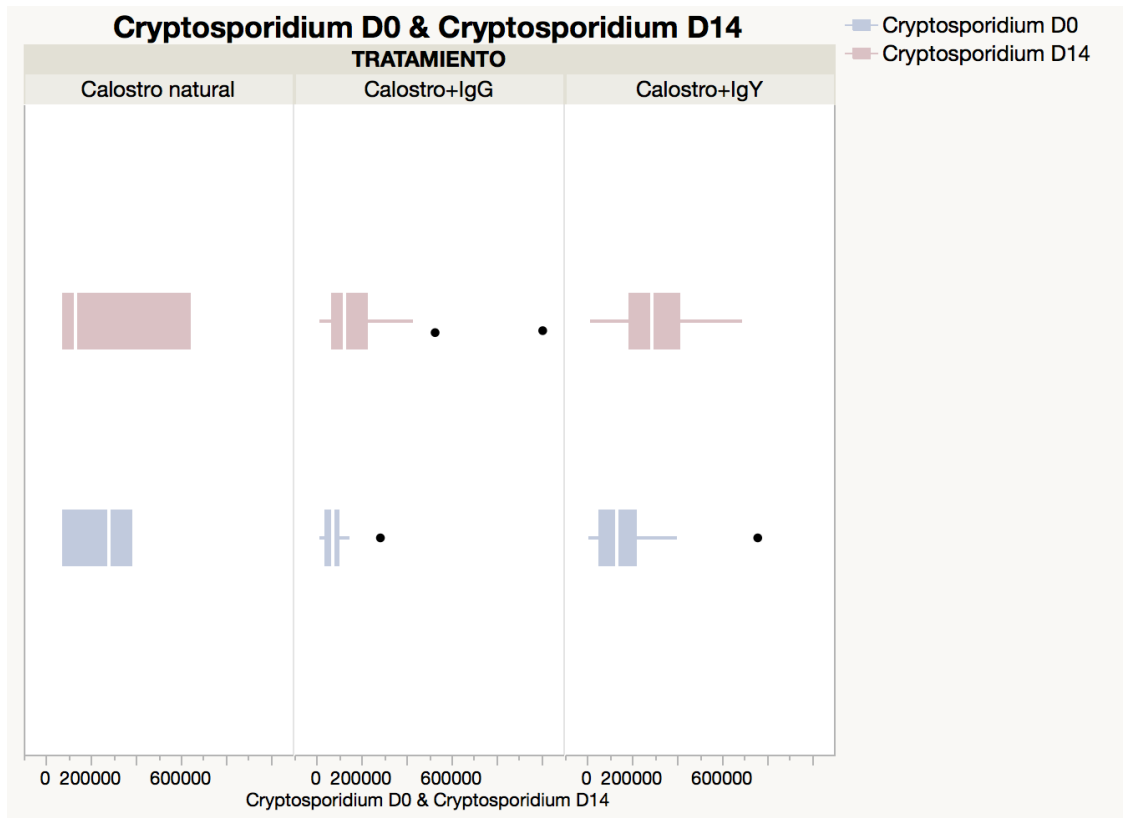
En cuanto a los datos de calostro y suero sanguíneo, los resultados fueron: el sistema Brix identificó que el calostro natural adicionado con IgG presentaba una densidad mayor y el adicionado con IgY se diluía más que el calostro natural, no se identificaron diferencias estadísticas. En cuanto a la refractometría, se encontraba en los estándares de 5.5 g/dl deseables en todos los tratamientos, ligeramente más bajos en el grupo adicionado con IgY. En cuanto al contenido de inmunoglobulinas en suero, se determinó que el calostro natural y el calostro agregado con IgG, no llegaba al estándar de la industria del mínimo de 1340 mg/dl de IgG en suero sanguíneo. Si bien el calostro natural agregado con IgY si sobrepasa este estándar no presenta diferencias estadísticas con los otros dos tratamientos. Sin embargo, si indica que no hay interferencia en la absorción de IgG, e incluso aumenta la eficiencia (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los tres grupos de estudio

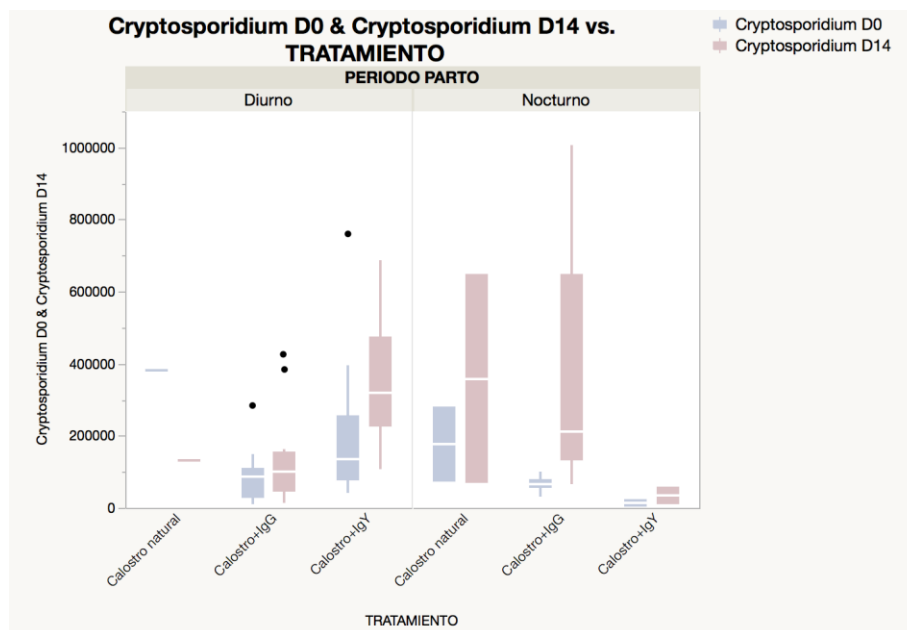
Tratamiento	Brix suero	Refractometría (g/dl)	IgG's (ELISA) (mg/dl)
Calostro natural	9.4 ± 0.98	5.86 ± =.83	1268.54±93.3
Calostro natural + IgG	10.4 ± 2.9	6.75± 2.6	1265.97±219.40
Calostro natural + IgY	8.72 ±0.80	5.2 ± 0.77	1375.65±158.77 ^a

^a Grupo Calostro Natural mas Igy Valor (p= 0.06)

La gráfica 1 muestra que durante el día de pico de producción de *Cryptosporidium parvum* en los becerros, no hubo diferencias entre los tratamientos, de tal manera que la inmunidad pasiva adquirida en las primeras horas de vida, no importando el producto agregado al calostro natural, no es suficiente para evitar la excreción en millones de oocistos de *Cryptosporidium* al ambiente. Para el calostro natural se observaron $2,83 \times 10^4$ oocistos por ml, en los becerros con calostro natural + IgG: $2,5 \times 10^4$ oocistos por ml y para los becerros con calostro natural + IgY: $3,07 \times 10^4$ oocistos por ml. Esto solo representa un análisis preliminar, se debe analizar hasta los 28 días de edad, para ver si la inmunidad activa de los becerros se ve influenciada por el tratamiento (Gráfica 1).

Gráfica 1. Análisis de tratamiento y control de *Cryptosporidium parvum* a los 14 días de edad

La gráfica 2 demuestra que los tratamientos nocturnos fueron más eficientes que los diurnos, por lo que se revisaron los sistemas de descongelamiento y ofrecimiento del calostro a los becerros, lo que puede representar un sesgo en el control de enteropatógenos.

Gráfica 2. Tratamientos diurnos y nocturnos para el control de *Cryptosporidium parvum*

CONCLUSIONES

El calostro natural y el calostro natural adicionado con IgG, no llegan al estándar de la industria. Las IgY adicionadas al calostro natural, permiten una mejor eficiencia de absorción de IgG. Ningún tratamiento reduce el número de oocistos de *Cryptosporidium parvum* en becerros, y el 100% de los mismos presentaron oocistos en sus muestras fecales.

BIBLIOGRAFIA

1. Almajay, J., Prattley, D., French, N., Lopez-Villalobos, N., Hedgespeth, B., & Grinberg, A. (2013). Utility of halofuginone lactate for the prevention of natural cryptosporidiosis of calves, in the presence of co-infection with rotavirus and *Salmonella typhimurium*. *Veterinary Parasitology*, 197(1-2), 59-67. Baumrucker, C. R., Burkett, A. M., Magliaro-
2. Besser, T., Garmedia, A., McGuire, T. and Gay, C. (1985). Effect of Colostral Immunoglobulin G1 and Immunoglobulin M Concentrations on Immunoglobulin Absorption in Calves. *Journal of Dairy Science*, 68(8), pp.2033-2037.
3. Beam, A. L., Lombard, J. E., Kopral, C. A., Garber, L. P., Winter, A. L., Hicks, J. A., & Schlater, J. L. (2009). Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of dairy science*, 92(8), 3973-3980.
4. Butler, J. E. (1995). Antigen receptors, their immunomodulation and the immunoglobulin genes of cattle and swine. *Livestock Production Science*, 42(2-3), 105-121.
5. Carlander, D., Kollberg, H., Wejåker, P. E., & Larsson, A. (2000). Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunologic research*, 21(1), 1-6.
6. Cortese, V. S. (2009). Neonatal immunology. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 25(1), 221-227.
7. Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., & Théwis, A. (2009). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2), 295.
8. Dairy Heifer Raiser (2011). An overview of operations that specialize in raising dairy heifers. USDA.
9. Diraviyam, T., Zhao, B., Wang, Y., Schade, R., Michael, A., & Zhang, X. (2014). Effect of

- Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) against Diarrhea in Domesticated Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos ONE*, 9(5), e97716.
10. Foster, D. M., & Smith, G. W. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 25(1), 13-36.
 11. Gold Standards (2016). Dairy Calf and Heifer Association.
 12. Health Inspection Service, Veterinary Services. 1993. Transfer of maternal immunity to calves. Highlights of the National Dairy Heifer Evaluation Program. Bull. No. N118.0293. USDA.
 13. Lee, E., Sunwoo, H., Menninen, K. and Sim, J. (2002). In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, 81(5), pp.632-641.
 14. Quigley, J. 3., Kost, C. J., & Wolfe, T. M. (2002). Absorption of Protein and IgG in Calves Fed a Colostrum Supplement or Replacer¹. *Journal of dairy science*, 85(5), 1243-1248.
 15. Macrina, A. L., Dechow, C. D. (2010). Colostrum: mass transfer of immunoglobulin G 1 into colostrum. *Journal of dairy science*, 93(7), 3031-3038.
 16. Meganck, V., Hoflack, G., Piepers, S., & Opsomer, G. (2015). Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(1), 64-70.
 17. Morin, D. E., Constable, P. D., Maunsell, F. P., & McCoy, G. C. (2001). Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. *Journal of dairy science*, 84(4), 937-943.
 18. Parreño, V., Marcoppido, G., Vega, C., Garaicoechea, L., Rodríguez, D., Saif, L., & Fernández, F. (2010). Milk supplemented with immune colostrum: Protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 136(1), 12-27.
 19. Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (Eds.). (2006). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences.
 20. Rao, C. D., Gowda, K., & Reddy, B. Y. (2000). Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology*, 276(1), 104-113.
 21. Tyler, J. W., Hancock, D. D., Thorne, J. G., Gay, C. C., & Gay, J. M. (1999). Partitioning the mortality risk associated with inadequate passive transfer of colostrum immunoglobulins in dairy calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(4), 335-337.
 22. Trotz-Williams, L. A., Leslie, K. E., & Peregrine, A. S. (2008). Passive immunity in Ontario dairy calves and investigation of its association with calf management practices. *Journal of dairy science*, 91(10), 3840-3849.
 23. Vázquez-Flores, S.^a, Geiger, A., Olamendi-Uresti, AE, Aguilar-López, DM, Díaz-Avila, LE. Lucio-Rodríguez, C. (2018) Determinación de IgG en suero sanguíneo de machos Holstein alimentados con calostro de vaquillas suplementado con calostro deshidratado. *Journal of Dairy Science* (aceptado)
 24. Vega, C., Bok, M., Chacana, P., Saif, L., Fernandez, F., & Parreño, V. (2011). Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Veterinary immunology and immunopathology*, 142(3), 156-169.
 25. Wells, S. J., Dargatz, D. A., & Ott, S. L. (1996). Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 29(1), 9-19.
 26. Wooding, F.B.P. and Flint, A.P.F. (1994) Placentation. Chapter 4 in G.E. Lamming, ed. *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th ed. 3(1): 233-460. Chapman & Hall, London.
 27. Windeyer, M. C., Leslie, K. E., Godden, S. M., Hodgins, D. C., Lissemore, K. D., & LeBlanc, S. J. (2014). Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive veterinary medicine*, 113(2), 231-240.
 28. Xu, M. L., Kim, H. J., & Kim, H. J. (2014). Effect of dietary bovine colostrum on the responses of immune cells to stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *Archives of pharmaceutical research*, 37(4), 494-500.

CLONACIÓN DE EMBRIONES DE CHAROLLAIS, UNA RAZA MEJORADA DE OVINO DOMÉSTICO.

José Roberto Vazquez Avendaño¹, Sarahí Hernández Martínez¹, José Ernesto Hernández Pichardo², Raymundo Rangel Santos³, Demetrio Alonso Ambríz García¹, María del Carmen Navarro Maldonado*¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, ²Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, ³Universidad Autónoma Chapingo.

*carmenavarrro2006@yahoo.com.mx

RESUMEN

La clonación de embriones es un proceso reproductivo que ocurre con cierta frecuencia en la naturaleza, tal es el caso de los gemelos monocigóticos. Sin embargo, también se puede realizar artificialmente en el laboratorio, mediante la bipartición embrionaria, el aislamiento y cultivo de blastómeros y por la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS), la cual requiere la información genética de las células somáticas del individuo que se desea clonar. La TNCS permite clonar organismos de alto valor genético para conservar las características deseables de importancia económica para beneficio del sector productivo. El objetivo del presente trabajo fue generar embriones clones a partir de células somáticas de piel de oreja de borrega Charollais, una raza mejorada de ovino doméstico (*Ovis aries*). Se produjeron 47 embriones clones evaluándose su desarrollo a las 96 y 168 horas de cultivo *in vitro*. A las 96 horas se observaron embriones de 1 blastómero (2 cigotos, 4.2%), 2 blastómeros (1, 2.1%), 12-14 blastómeros (2, 4.2%), mórula temprana (17, 36.1%), mórula compacta (15, 31.9%) y fragmentados (10, 21.2%). A las 168 horas se observaron mórulas compactas (4, 8.5%) y blastocistos (13, 27.6%). Este último estadio se clasificó como calidad 1 (6, 46.1%), 2 (3, 23.0%) y 3 (4, 30.7%) de acuerdo al manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). Se concluye que fue posible producir satisfactoriamente embriones clones de borrega Charollais. El 27.7% de estos embriones alcanzaron la etapa de blastocisto, de los cuales el 69.1% fueron catalogados como calidad 1 y 2, lo que sugiere una alta probabilidad de implantación al ser transferidos a hembras subrogadas.

INTRODUCCIÓN

La generación de embriones clones por transferencia nuclear de células somáticas es una biotecnología que utiliza células somáticas del individuo que se desea clonar, estas células donarán la información genética contenida en su núcleo, al ser introducido en un ovocito que previamente se le retiró su material genético, dejando solamente el citoplasma. A partir de la unión de ambos elementos celulares, se formará un embrión clon que originará un individuo genéticamente similar al organismo que dono la información genética (Solter, 2000).

Se han clonado diferentes mamíferos por TNCS, entre las cuales se encuentran tanto especies silvestres como domésticas, estas últimas pueden ser animales de interés productivo en el sector pecuario, para la producción de carne, leche, lana, entre otros derivados. Algunos de los animales de granja que se han clonado son bovinos, porcinos, equinos, caprinos y ovinos.

Las principales razas de ovino producidas en México son: Rambouillet, Dorset, Hampshire, Suffolk, Katahdin, Pelibuey, Black Belly, Saint Croix, Dorper y Charollais, entre otras. Esta última, es de origen francés y fue introducida a México en 1995, actualmente se produce en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Veracruz y Estado de México (AMCA, 2007).

La raza Charollais es de una excelente aptitud cárnica, tiene rápido crecimiento (ganancia de peso), una gran conformación y originan una excelente calidad de canal, por lo que es considerada de alta eficiencia comercial. En México se considera una raza de alto valor, sin embargo, se cuentan con pocos ejemplares en comparación con las demás razas, lo cual la convierte en un blanco para la producción de pie de cría y conservación. Una opción de propagar la genética de estos ejemplares es por medio de la clonación, de esta manera se pueden obtener individuos con características idénticas a los mejores ejemplares de raza Charollais.

PARTE EXPERIMENTAL

Deriva de células somáticas

Se colectó una biopsia de piel de oreja de una oveja raza Charollais del Rancho "Poza Rica" ubicado en Singuilucan, estado de Hidalgo. En el laboratorio, el tejido fue disgregado con una solución de colagenasa tipo I y II (0.02%), para ello la muestra se mantuvo en constante movimiento oscilatorio durante 3 horas a 37.5 °C. Las células obtenidas se sembraron en cajas de Petri de 35 mm con 3 mL de DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) suplementado (2% de antibiótico-antimicótico, 2.6% de bicarbonato de sodio y 10% de suero fetal bovino) y se incubaron a 37.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 7 días (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015). Una vez que los fibroblastos alcanzaron una confluencia del 80 al 100% se les realizó un pasaje celular, el cual consistió en desprenderlos de la caja de cultivo mediante su incubación durante 5 min en 700 µL de tripsina-verseno (0.05%/0.05%). Al finalizar el tiempo se adicionaron 2 mL de DMEM suplementado. La solución con las células suspendidas se centrifugó a 150 x g durante 4 min, se decantó el sobrenadante y la población celular se resembró en dos cajas de Petri, cada una con 3 mL de medio. Cada 7 días se realizó un pasaje celular hasta que las células alcanzaron el 4º pasaje, en cual se criopreservaron en medio de congelación a base de DMSO y se almacenaron a -196 °C. Estas células se descongelaron y se resembraron 7 días antes de cada experimento de clonación.

Maduración in vitro de ovocitos

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios colectados de ovejas domésticas recién sacrificadas en un rastro del Estado de México. Los ovarios se trasladaron al laboratorio en DPBS a 30-35 °C. Una vez en el laboratorio, se lavaron isotérmicamente en DPBS. Con base a la metodología de Robledo-Verduzco *et al.* (2009), los ovocitos se obtuvieron mediante la aspiración de los folículos con jeringa de 10 mL y aguja calibre 20 mm, utilizando como medio de soporte TCM-199 con Hepes suplementado con heparina (100 UI/mL). Los ovocitos se colocaron en una caja Petri para seleccionar aquellos con mayor número de capas de células de la granulosa (Kakkassery *et al.*, 2010) y que no presenten anomalías morfológicas (ASEBIR, 2015).

Los ovocitos seleccionados se maduraron *in vitro* (MIV), colocándolos en cajas de 4 celdas, cada celda contenía 500 µL de TCM-199 suplementado con Cisteína (0.57 mM), D-glucosa (3.05 mM), alcohol polivinílico (PVA, 0.1%), Piruvato de sodio (0.91 mM), 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), Gonadotropina Coriónica Humana (hCG, 5 UI/mL, Ferring pharmaceuticals), Hormona Folículo Estimulante (FSH, 0.1 UI/mL, Merck Serono), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, 10 ng/mL) y antibiótico-antimicótico (2%); las celdas se cubrieron con aceite mineral. Esto para ser incubados por 20 horas (Rodríguez-Suástegui, 2012). Posteriormente se seleccionarán aquellos ovocitos que mostraron expansión de las células de la granulosa, como primer criterio de maduración. Los ovocitos se colocaron en hialuronidasa (0.5 mg/mL) para retirar estas células. Una vez desnudados los ovocitos, se procedió a identificar la presencia del primer cuerpo polar (1º CP), como segundo criterio de maduración (metafase II). Los ovocitos que presentaron 1º CP fueron incubados por una hora en demecolcina (10 µg/mL) para generar la extrusión de la placa metafásica. Inmediatamente, se dirigió la zona pelúcida (ZP) con pronasa (2 mg/mL) durante 8 minutos (Vajta *et al.*, 2003).

Enucleación de los ovocitos (citoplastos)

Los ovocitos que presentaron 1º CP y extrusión de la placa metafásica se enuclearon manualmente en medio T10 (TCM-199 con 10% de SFB). El corte se realizó con una micronavaja, de tal manera que en una pequeña porción citoplasmática se retirara el 1º CP y la placa metafásica. Las porciones del citoplasma sin núcleo (citoplastos) se mantuvieron en medio T20 para su reconstitución, es decir, que retomaran su forma esférica. (Vajta *et al.*, 2003).

Fusión

Para la fusión, se formaron tripletes tomando dos citoplastos que se sumergieron en una solución de fitohemaglutinina (5 mg/mL), después se unieron a un fibroblasto en medio T2, colocando este último entre los dos citoplastos. Los tripletes formados se equilibraron en medio de fusión (5.46 g de D-Manitol y 0.1 g de PVA disueltos en 98 mL de agua destilada) y se colocaron en una cámara de fusión (BTX microslide, 0.5 mm de apertura, modelo 450). Se alinearon los tripletes al electrodo positivo, dejando pasar una corriente alterna (AC) de 4V, después se aumentó la AC a 9V y se dejó pasar una corriente directa (DC) de 100 V durante 9 µseg. Posteriormente, los tripletes se colocaron en medio T20 para esperar su fusión en una sola célula. Una vez formada la célula, se incubaron en medio Cleavage (Cook Medical) durante 3 horas para su reprogramación nuclear.

Activación

Los tripletes reconstruido fueron activados químicamente, para lo cual se incubaron en medio T2 con 8 μM de ionóforo de calcio durante 5 min. Después las células se colocaron de manera individual en gotas de 2 μL de medio Cleavage con 2mM de 6-dimetilaminopurina y se dejaron incubar por espacio de 4 horas.

Cultivo de Embriones

Al finalizar el tiempo de incubación las células se cultivaron en el sistema WOW (Well of the Well) o de micropozos (Vajta *et al.* 2000), utilizando un medio secuencial humano para el desarrollo embrionario es decir, durante 4 días se cultivaron los embriones en medio Cleavage, para favorecer la segmentación y el desarrollo de los embriones en etapa de mórula, Y los días restantes se cultivaron en medio Blastocyst, para favorecer el desarrollo a la etapa de blastocisto (Cook Medical) (Vazquez *et al.*, 2017).

Evaluación de la calidad morfológica embrionaria

Los embriones clones de oveja raza Charollais fueron evaluados y clasificados con base en los parámetros de calidad morfológica tomados del manual de la IETS (Stringfellow y Givens, 2011) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Código numérico de calidad morfológica de acuerdo a la IETS.

Código Morfológico	Calidad	Descripción
1	Excelente	Masa embrionaria simétrica y esférica, con blastómeros individuales, uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión coincide con la etapa de desarrollo esperado. Las irregularidades deben ser relativamente menores y el 85% del material celular debe de ser una masa embrionaria intacta y viable. Este criterio debe basarse en el porcentaje de fragmentos liberados.
2	Buena	Irregularidades moderadas en la forma total de la masa embrionaria y/o en el tamaño, color y densidad de los blastómeros. Por lo menos, el 50% del material celular debe de ser una masa embrionaria intacta y viable.
3	Mala	Irregularidades importantes en la forma total de la masa embrionaria y/o en el tamaño, color, y densidad de las células individuales. Al menos, el 25% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable.

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow y Givens, 2011)

RESULTADOS

Se generaron 47 tripletes reconstruidos de los cuales, 45 segmentaron (95.7%). Como se muestra en la Cuadro 2, se evaluó el desarrollo de los embriones clones a las 96 y 168 horas de cultivo *in vitro*. De los 45 tripletes que respondieron al tratamiento de activación y segmentaron, 13 (27.7%) alcanzaron la etapa de blastocisto a las 168 horas de desarrollo embrionario, de los cuales, 6 blastocistos (46.1%) fueron clasificados como calidad 1 (Figura 1), 3 blastocistos (23.0%) como calidad 2 (Figura 2) y 4 blastocistos (30.7%) se clasificaron como calidad 3 (Figura 3).

Cuadro 2. Desarrollo de embriones clones de Charollais a las 96 y 168 horas de cultivo *in vitro*.

		Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones clones							
n (%)		96 horas					168 horas		
<i>Pasaje</i>	<i>N</i>	<i>1-Cél</i>	<i>2-Cél</i>	<i>12-14 Cél</i>	<i>M</i>	<i>MC</i>	<i>Frag</i>	<i>MC</i>	<i>B</i>
6°	16	1 (6.2)	1 (6.2)	-	6 (37.5)	4 (25.0)	4 (25.0)	-	6 (37.5)
7°	16	1 (6.2)	-	1 (6.2)	8 (50.0)	4 (25)	2 (12.5)	1 (6.2)	3 (18.7)
8°	15	-	-	1 (6.6)	3 (20.0)	7 (46.6)	4 (26.6)	3 (20.0)	4 (26.6)
Total	47	2 (4.2)	1 (2.1)	2 (4.2)	17 (36.1)	15 (31.9)	10 (21.2)	4 (8.5)	13 (27.6)
$\bar{x} \pm DE$		0.7±0.6	0.3±0.6	0.7±0.6	5.7±2.5	5.0±1.7	3.3±1.2	1.3±1.5	4.3±1.5
		6	6	6					

Estadios de desarrollo. M: Mórula, MC: Mórula compacta, Frag: Fragmentado, B: Blastocisto.

Figura 1. Embriones clones de ovino raza Charollais en etapa de blastocisto clasificados como calidad 1.

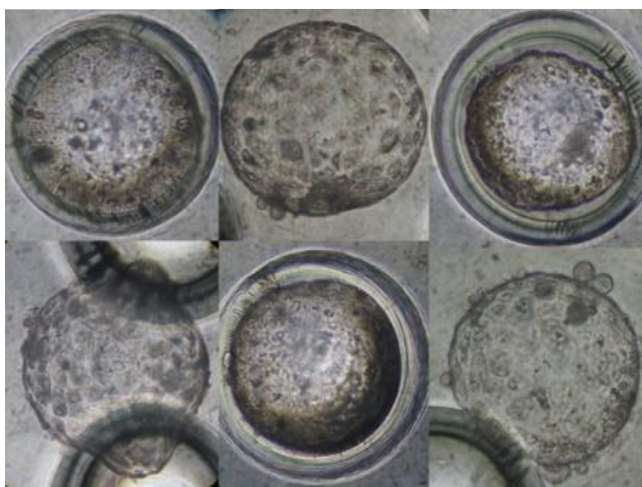


Figura 2. Embriones clones de ovino raza Charollais en etapa de blastocisto clasificados como calidad 2.

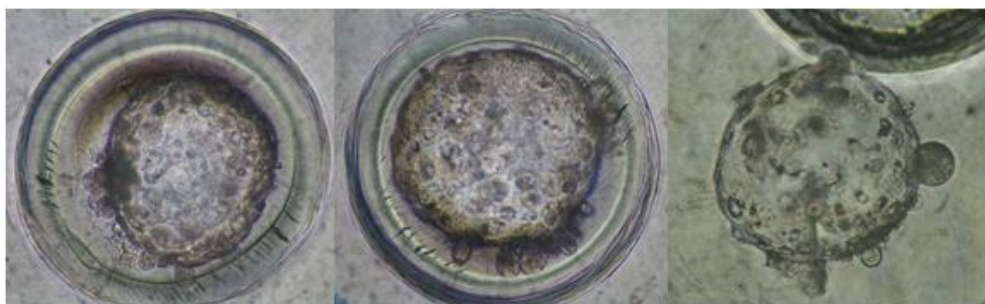
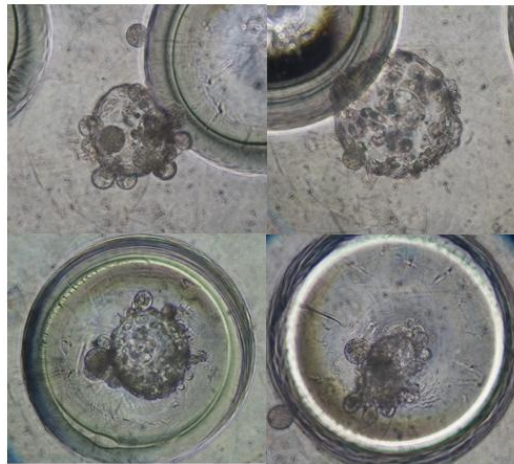


Figura 3. Embriones clones de ovino raza Charollais en etapa de blastocisto clasificados como calidad 3.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Fue posible producir satisfactoriamente embriones clones de la raza ovina productiva Charollais. Del total de embriones producidos, un 27.6% alcanzaron la etapa de blastocisto, lo cual es superior a lo obtenido por Zhang *et al.* (2013) en ovino doméstico, donde reportaron una tasa de 13.8% a menores pasajes celulares del fibroblasto (8^o). También los datos aquí obtenidos son superiores a los reportados por Khan *et al.*, (2018), con un 12.4% en la misma especie. Fue posible, además, evaluar la calidad de estos embriones mediante el manual de la IETS, determinando así, el 69.1% de blastocistos producidos como calidad 1 y 2. Criterios que fueron posibles también de implementar en embriones clones de ovino silvestre en el estudio de Hernández (2017) donde obtuvo un 80% de calidad 1 y 2, datos superiores a lo aquí reportado, esto probablemente debido a la especie y a la confirmación objetiva de las calidades mediante tinción de núcleos y viabilidad.

El resultado del presente estudio sugiere la factibilidad de producir embriones clones de buena calidad (1 y 2), de una raza ovina mejorada, con una alta probabilidad de implantación al ser transferidos a hembras subrogadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos, Catalogo de razas de Borregos, 2007, pp. 30.
2. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, "Criterio ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos", Cuadernos de Embriología clínica, 3^a Edición, 2015, España, pp. 94.
3. D. A. Stringfellow, M. D. Givens, "Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4^a edición. Chapaing, Illinois. USA. pp. 165.
4. D. Solter (2000) Mammalian cloning: advances and limitations, Nature Reviews Genetics, 1(3): 199-207.
5. G. Vajta, T. T. Peura, P. Holm, A. Páldi, T. Greve, A. O. Trounson, H. Callesen, "New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The well of the well (WOW) system", *Mol. Reprod. Dev.*, Vol. 3, 55, 2000, pp. 256-264.
6. G. Vajta, I. M. Lewis, A. O. Trounson, S. Purup, P. Maddox-Hyttel, M. Schmidt, H. G. Pedersen, T. Greve, H. Callesen, "Handmade somatic cell cloning in cattle: Analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*", *Biol. Reprod.*, Vol. 68, 2, 2003, pp. 571-578.
7. J. L. Rodríguez-Suástegui, S. Romo-García, Y. Ducolomb, E. Casas-Hernández, J. E. Hernández-Pichardo, "Desarrollo de mórulas de ovino en medio simple o secuencial:

- relación entre evaluación morfológica y viabilidad embrionaria”, *Rev. Salud Anim.*, Vol. 39, 1, 2017, pp. 9-18.
8. J. M. Robledo-Verduzco, J. Herrera-Camacho, M. Cajero-Juárez, M. C. Navarro-Maldonado, A. García-Valladares, “Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos”, *Trop. Subtrop. Agroecosyst.*, Vol. 10, 1, 2009, pp. 95-99.
 9. J. R. Vazquez, S. Hernández, J. E. Hernández, J. A. Rivera, D. A. Ambríz, M. C. Navarro, “Producción de blastocistos de hembra *Ovis canadensis mexicana* por clonación manual interespecífica: efecto del uso de medio secuencial humano” *Acta. Zool. Mex. (n.s.)*, Vol. 33, 3, 2017, pp. 328-338.
 10. M. C. Navarro-Maldonado, S. Hernández-Martínez, J. R. Vazquez-Avenidaño, J. L. Martínez-Ibarra, N. L. Zavala-Vega, B. Vargas-Miranda, J. A. Rivera-Rebolledo, D. A. Ambríz-García, “Deriva de células epiteliales de tejido de piel descongelado de *Ovis canadensis mexicana* para la formación de un banco de germoplasma”, *Acta Zool. Mex. (n.s.)*, Vol. 31, 2, 2015, pp. 275-282.
 11. M. P. Kakkassery, V. Vijayakumara, T. Sreekumara, “Effect of cumulus oocyte complex morphology on *in vitro* maturation of bovine oocytes”, *J. Vet. Anim. Sci.*, Vol. 41, pp. 12-17.
 12. P. Zhang, P. Liu, H. Dou, L. Chen, L. Lin, P. Tan, G. Vajta, J. Gao, Y. Du, R. Z. Ma. “Handmade cloned transgenic sheep rich in Omega-3 fatty acids”, *Plos One*, Vol. 8, 2013, pp 1-9.
 13. S. Khan, M. Tali, A. Khan, S. Bhat, A. Ashraf, M. H. Bhat, F. Khan, R. A. Shah, “Comparison of efficiency of *in vitro* cloned sheep embryo production by conventional somatic cell nuclear transfer and handmade cloning technique”, *Reprod Domest Anim.*, Vol. 53, 2, pp 512-518.
 14. S. Hernández M., “Evaluación de calidad morfológica de embriones clones de *Ovis canadensis mexicana*”, Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de Maestría en Biología de la Reproducción Animal. México, pp 96.

EVALUACIÓN DE LA CONSERVACIÓN DE VALORES NUTRIMENTALES EN POST COSECHA DE MAÍZ AZUL POR ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

Jesús Alarcón Bonilla^{1,2}, Elías L. Meneses Moreno¹, Fernando I. Campos Clemente¹, Eduardo Rodríguez Cuevas¹, Janeth Fuentes Hernández¹ y Paola Solís Vences²

¹Universidad Tecnológica de Tecámac, ²Universidad Tecnológica de México

RESUMEN

Hoy en día, el país está experimentando cambios significativos en el sector agrícola debido al interés biotecnológico que hay en el mismo, tal es el caso del maíz azul, el cual presenta moléculas bioactivas llamadas flavonoides como las antocianinas, los cuales son compuestos cromóforos hidrosolubles que poseen propiedades antioxidantes y por tanto pueden ser utilizados en el sector alimenticio, cosmético y farmacéutico. Actualmente, las antocianinas del maíz azul son aplicadas en el sector alimenticio como colorantes de vinos, mermeladas y jugos de fruta o bien como antioxidantes. También son aplicadas en la industria cosmética y textil en la cual se utiliza la coronta del maíz azul. Sin embargo, es de suma importancia el conservar y renovar el banco de germoplasma de maíz azul para contar con una fuente de suministros para la obtención de pigmentos de interés biotecnológico. Para ello, se llevó a cabo un análisis químico proximal basado en NOMs a partir de la semilla utilizada para siembra obteniéndose valores promedio de % Humedad 8.74, %Cenizas: 1.49, % de Extracto etéreo: 3.41, % de Fibra Cruda: 4.19 y % de Nitrógeno orgánico: 0.42. Complementariamente, en la semilla obtenida de la cosecha los resultados fueron 36.2% de Humedad, 1.52% de Cenizas, 23% de Grasas (extracto etéreo), 6.2% de Fibra Cruda y 0.23% de Nitrógeno orgánico. Como era de esperarse, las variaciones sobre todo en humedad son debido a la antigüedad de 4 años de la semilla previamente analizada con respecto a la recién cosechada. Adicionalmente, para el control del gusano cogollero se aplicaron a las parcelas un plaguicida hecho a base de cenizas de carbón, cal y jabón.

INTRODUCCIÓN

El maíz es un producto milenario, pues su cultivo se remonta a la época prehispánica y sigue siendo uno de los cultivos de mayor presencia en el país desde diferentes puntos de vista: alimentario, ganadero, económico y social. Es uno de los productos más importantes de México ya que es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del trigo (SIAP, 2008).

De acuerdo con Sánchez (2011), del total de producción de maíz en México, el 57% es destinado para consumo humano, el 29% es para el consumo animal y 20 % para la industria. Dentro de las principales especies de maíz se encuentra el blanco, el amarillo, y el azul, de los cuales el maíz blanco se produce exclusivamente para el consumo humano por su alto contenido nutricional, mientras que el amarillo es destinado al procesamiento industrial y a la alimentación animal, y el maíz azul es utilizado para elaborar atole o tortillas entre otros.

Cabe mencionar que cuando se habla de la producción de maíz para la conservación del germoplasma se debe tener el cuidado necesario durante su desarrollo, pues este requiere de nutrientes necesarios para el mantenimiento del grano, así mismo como la aplicación de abonos o fertilizantes para ayudar a la planta a obtener un excelente crecimiento. En México existe una gran diversidad de variedades de maíz azul, con su correspondiente variabilidad en tamaño, densidad y dureza del grano, así como en su composición química. Estas variables están definidas por el factor genético, prácticas de cultivo, condiciones climáticas, tipo de suelo y su interacción entre estos factores (Agama.2011).

El presente trabajo se enfocó en la evaluación de la conservación de los valores nutrimentales en post cosecha del maíz azul con la finalidad de determinar si el germoplasma analizado conservó o incluso aumentó su valor nutrimental en la cosecha. Lo anterior se determinó a partir de pruebas bromatológicas y así determinar si las semillas son aptas para su conservación dentro del banco de germoplasma.

TEORÍA

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas. Su nombre científico es *Zea mays*. Debido a que el maíz se ha cultivado en casi todas las partes del mundo, es posible encontrar plantas de este

cereal con algunas características diferentes (Parsons, 2001). El maíz es un símbolo cultural de gran importancia histórica en México, y su enorme capacidad para adaptarse tiene que ver con las características fisiológicas de la planta, pero más tiene que ver con el interés, la sabiduría y la pasión de experimentadores agrícolas durante miles de años. Debido a su versatilidad y propiedades alimenticias, esta planta es, sin lugar a dudas, una de las mejores aportaciones de México para el mundo; y desde el punto de vista, político, económico y social, el maíz es el cultivo más importante del país (SAGARPA, 2016).

Tipos de maíz: blanco, amarillo y azul

Aunque se ha hecho mención de tres variedades principales de maíz: el blanco, que se cultiva para el consumo humano por su alto contenido nutricional; el amarillo, destinado principalmente al procesamiento industrial y a la alimentación de animales; y el azul, que se utiliza principalmente para la elaboración de tortillas, atoles y pinoles, siendo éste el más nutritivo y el que más compuestos antioxidantes tiene es el maíz azul. Esta misma variedad contiene un nivel de fibra mucho más alto que la mayoría de los cereales, mientras que sus carbohidratos son de fácil digestión. El maíz azul se caracteriza por sus mazorcas alargadas, con granos cristalinos de coloración azul púrpura. Las condiciones necesarias para su cultivo se encuentran en Chihuahua, principalmente en la Sierra Tarahumara, pero también se cultivan, en menor medida, en algunas otras regiones del país como Veracruz, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala (Salinas *et al.*, 2010).

Maíz azul: características

En la actualidad se cultivan maíces de diferentes formas y tonalidades de grano; los azules, negros, guindas, púrpura y rojos se conocen como maíces pigmentados. Diversas instituciones de investigación nacional e internacional conservan las semillas de muchas de estas razas pigmentadas que han colectado en los estados de Puebla, Guerrero, Oaxaca, Estado de México y Chiapas, principalmente. A pesar de que los maíces pigmentados son apreciados en las comunidades productoras y los utilizan para preparar platillos tradicionales, éstos se encuentran en riesgo de desaparecer por la disminución del área de cultivo, su limitado uso y la baja demanda como materia prima para los molinos de maíz. Ante ello, las universidades y centros de investigación realizan estudios para conservarlos, promover su siembra y mejorar su productividad en el campo (Ramírez, *et al.*, 2017).

Para el uso de los maíces en la alimentación diaria es necesario estudiar la estructura del grano y los compuestos químicos que contiene. Ahora se sabe que están formados por diversas estructuras, como son el pericarpio, el endospermo, el germen y la cofia o pedicelo. En estas estructuras se almacenan la fibra, los carbohidratos, las proteínas y las grasas que han servido de alimento para la población desde hace miles de años y en la actualidad es una de las materias primas más importantes en la industria alimentaria. A diferencia de los granos blancos, los pigmentados poseen compuestos químicos llamados antocianinas, que les dan colores vistosos. Algunos maíces tienen antocianinas en el pericarpio y en la aleurona, otros sólo en alguna de estas estructuras, e incluso se han observado pigmentos en su endospermo. Estas sustancias no son tóxicas al ser humano, al contrario son muy importantes porque tienen propiedades nutraceuticas y antioxidantes, esto quiere decir que al consumirlas los seres humanos ayudan a mantener la salud y previenen la aparición o desarrollo de enfermedades como el cáncer (Salinas, *et al.*, 2013). No solo las antocianinas del grano tienen función antioxidante, hay un grupo más amplio de sustancias que están presentes en los maíces pigmentados y que son benéficas para los seres humanos. Entre estos compuestos fitoquímicos están los fenoles, flavonoides, ácido ferúlico, luteína, zeaxantina, criptoxantina y beta carotenos, entre otros.

Todos estos han sido estudiados en otros vegetales y han demostrado efectos benéficos en la salud y prevención de enfermedades (Zhao *et al.*, 2009). Al mismo tiempo, se ha observado que estas sustancias proveen: protección contra el estrés oxidativo de las células, previniendo así el envejecimiento celular y la aparición de enfermedades degenerativas, superando el efecto antioxidante de la vitamina E. Tienen también propiedades anti - inflamatorias, antialérgicas, antitumorales y antimicrobianas. Protegen los vasos sanguíneos del daño ocasionado por los altos niveles de azúcar en pacientes diabéticos gracias a su efecto vaso relajante (De Pascual-Teresa y Sánchez- Ballesteros, 2008). Sin embargo, todavía son escasos los estudios sobre las propiedades biológicas y los efectos anticancerígenos de los productos elaborados tradicionalmente con maíces pigmentados.

PARTE EXPERIMENTAL

Para el análisis bromatológico antes de la siembra y después de la cosecha se utilizaron técnicas basadas en normas mexicanas. En el diagrama 1, se muestran los nombres de las pruebas y el orden en que fueron realizadas.

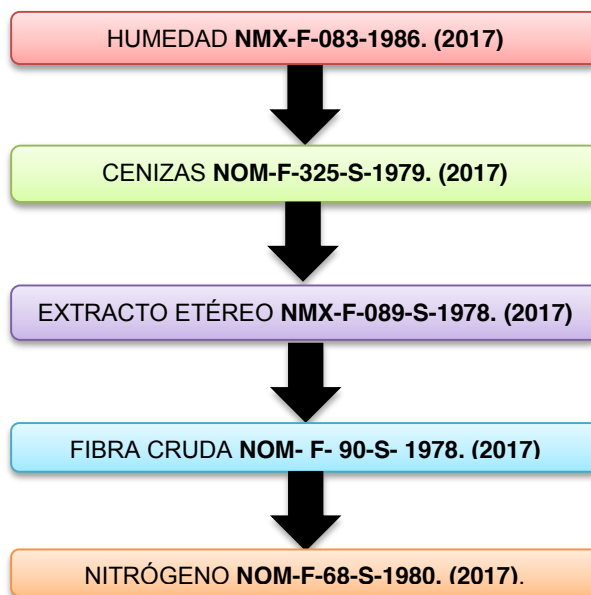


Figura 1. Estrategia experimental para los análisis bromatológicos.

Para la siembra y cosecha se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- Sanitización** de la semilla con hipoclorito de sodio al 1% por tres minutos y enjuague con agua estéril.
- Germinación de la semilla**, la cual se realizó en cajas Petri con algodón humedecido con agua, todo en condiciones estériles, colocando 4 semillas por caja. El riego se efectuó con 2 a 3 mL por caja por día durante 7 días.
- Trasplante de germinados** en bolsas con tierra estéril para el desarrollo de la plántula con riego constante a temperatura ambiente por tres semanas hasta adquirir una altura de plántula de 7 a 10 cm.
- Preparación del terreno** fueron dos áreas de 25 m², deshierbando, aflojando y nivelando el área de cultivo. Posteriormente se araron los surcos con 35 cm de separación cada uno.
- Trasplante de plántulas** con una altura de 7 a 10 cm en el suelo preparado con una distancia de 30 cm cada una. El riego fue terciado durante en la época de estiaje.
- Cosecha** se llevó a cabo después de 16 semanas. Las mazorcas cosechadas se procedió a realizar su descripción.

RESULTADOS

En la Figura 2 se muestran las plántulas crecidas después de 15 días de haber sido trasplantadas. Cabe señalar que durante el crecimiento del cultivo se presentó con baja frecuencia el Gusano Cogollero (Figura 3) el cuál se controló con un plaguicida hecho a base de cenizas de carbón, cal y jabón.



Figura 2. Plántulas trasplantadas después de 15 días Figura 3. Gusano Cogollero del maíz

Aunque la cosecha se llevó a cabo prematuramente debido a que algunos especímenes presentaron acame en las siguiente tabla se muestran las alturas alcanzadas en una de las 2 parcelas cosechadas

Tabla 1. Estatura alcanzada antes de cosecha de la parcela 1

Estatura del lote 1					
	A	B	C	D	E
	2.7	2.4	2.4	2.1	0.6
	2.1	2.4	2.4	2.4	1.8
	2.5	2.4	2.4	2.4	2.4
	2.6	2.4	2.4	2.4	1.8
	2.3	2.4	2.4	2.4	1.8
	2.6	2.4	2.4	2.1	1.8
	2.2	2.4	2.4	2.4	1.8
	2.1	2.4	2.4	1.8	1.7
Promedio	2.3	2.4	2.4	2.2	1.7
Prom. Gen.	2.2				

La caracterización fenotípica de la mazorca cosechada se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Características fenotípicas del maíz azul de la parcela 1

LOTE 1						
# de muestra	1	2	3	4	5	Promedio
Alto (cm)	16	18	18	15	17	16.8
Circunferencia (cm)	17	18	15	18	17	17
Aspecto (color)	morado	azul	azul	morados	azul	morados y azul
Diámetro (cm)	5.4	5.7	4.7	5.7	5.4	5.3
# de filas por maíz	13	18	14	13	16	14
Granos promedio por fila	31	29	32	28	29	29
Granos promedio por mazorca	403	522	448	364	464	440

Los resultados bromatológicos antes de la siembra y en post cosecha se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Resultados bromatológicos de la semilla de un banco de germoplasma de maíz azul.

Nombre de la prueba	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasas (%)	Fibra cruda (%)	Nitrógeno (%)
Resultados antes de la siembra	8.74	1.49	3.41	4.19	0.42
Resultados cosecha post	36.2	1.52	40	6.2	0.23
Resultados de referencia	37-38%	0.8%	33.2%	8.8%	3.7%

Como era de esperarse, las variaciones sobre todo en humedad son debido a la antigüedad de 4 años de la semilla previamente analizada con respecto a la recién cosechada. Esto se aprecia en el % Humedad debido a la antigüedad de la semilla. En lo referente a grasas no se alcanzó el valor de referencia debido a la antigüedad de la semilla y a la cosecha prematura en post cosecha debido al acame presentado misma situación pudo afectar el contenido de nitrógeno protéico.

CONCLUSIONES

La cosecha del maíz no fue realizada en el periodo adecuado debido al acame presentado por algunas plantas en ambas parcelas, Las alturas promedio de plantas fue de 2.2 y 2.4 m respectivamente para las parcelas 1 y 2. Las variaciones en los parámetros bromatológicos antes de la siembra y semilla cosechada aunque fueron cercanas a lo reportado en literatura factores como la antigüedad de la semilla procedente del banco de germoplasma y cosecha precoz fueron determinantes. El control de la plaga del gusano cogollero fue efectiva con el plaguicida hecho a base de cenizas de carbón, cal y jabón. Como perspectivas futuras se recomienda realizar siembras posteriores con la finalidad de acrecentar el volumen de semilla para la obtención de los pigmentos con actividad antioxidante presentes en el maíz azul.

REFERENCIAS

1. Agama, E. (2011). Características Físicas y Químicas De Dos Razas De Maíz Azul. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas. 3:317-329.
2. De Pascual-Teresa, S. y Sánchez B, M. T. (2008) Anthocyanins from plant to health. Obtenido el 28 de octubre de 2017 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-007-9074-0>
3. Parsons, D. V. (2001). Manuales para educación agropecuaria (Maíz). México: SEP/ Trillas. Pág. 37-56
4. Ramírez, G., Morán, B. H., Rico M. y Jiménez, P.C. (2017) Potencial nutracéutico de los maíces pigmentados. Obtenido el 22 de octubre de 2017 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/241208/FOLLETO_UAM- MAIZ.pdf
5. Salinas, M.Y., García, S.C., Coutiño, E., Bulmaro, V. y Martínez, V. A. (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. Obtenido el 27 de octubre de 2017 de <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/36-supl-3-A/2a.pdf>
6. Salinas, M. Y., Soria, R. J. y Espinosa, T. E. (2010). Aprovechamiento y distribución de maíz azul en el Estado de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Agropecuarias. Obtenido el 26 de octubre de 2017 de <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/FOLLETO%20TECNICO%20%20NO.%2042%20YOLANDA%20SALINAS.pdf>
7. Sánchez, A. (2011). Propiedades nutricionales y antioxidantes del maíz azul (Zea Mays L.). Departamento de ingeniería química, alimentos y ambiental. Fundación, Universidad de las Américas Puebla.
8. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2016) Maíz, alimento sagrado. Obtenido el 26 de octubre de 2017 de <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/maiz-alimento-sagrado?idiom=es>

9. SIAP, (2008). Servicio De Información Agropecuaria y Pesquera. Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Obtenido el 11 de diciembre de 2017 de : <http://www.siap.gob.mx>
10. Zhao, X., Zhang, C., Guigas, C., Corrales, M., Tauscher y Hu, X. (2009). Composition, antimicrobial activity and antiproliferative capacity of anthocyanin extracts of purple corn (*Zea Mays L.*) from China. Obtenido el 16 de octubre de 2017 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-008-0987-7>
11. NMX-F-083-1986. (2017). Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Obtenido el 14 de octubre de 2017 de <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-083-1986.PDF>.
12. NMX-F-089-S-1978. (2017). Determinación de extracto etéreo: (Método Soxhlet) en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Obtenido el 14 de octubre de 2017 de <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-089-S-1978.PDF>
13. Norma Oficial Mexicana NOM- F- 90-S- 1978. (2017) Determinación de fibra cruda en alimentos. Obtenida el 14 de octubre de 2017 de: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4799842&fecha=27/03/1979
14. Norma Oficial Mexicana NOM-F-68-S-1980. (2017). Alimentos Determinación de Proteínas, Determinación por Método Kjeldahl. Obtenido el 14 de octubre de 2017 de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980
15. Norma Oficial Mexicana NOM-F-325-S-1979. (2017). Determinación de cenizas en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Obtenido el 14 de octubre de 2017 de: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-066-S-1978.PDF>

EVALUACIÓN DE DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZANTES ORGÁNICOS EN LA PRODUCCIÓN DE LECHUGA BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

Jorge Humberto Medina Villarreal¹ Mariano Ángel Valdivia Dávila² Ofelia Iñiguez Gómez³ Olga Mora García⁴

Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara

INTRODUCCIÓN

La producción orgánica en México se inicia en la década de los ochenta en cultivos hortícolas, las cuales han representado una fuente de alimentación a lo largo de la historia de la humanidad, actualmente se les confiere de alto valor dietético y por su versatilidad de consumo tanto en fresco como procesado obtienen gran importancia en su interacción con el hombre. El consumo per cápita de hortalizas es altamente dependiente de la capacidad de compra de la población, en México se consume 56 Kg de verdura por habitante al año (Rendón, 1995).

En México se siembran alrededor de 512, 000 has de hortalizas lo que equivale a un 3.5 % de la superficie agrícola nacional y se obtiene una producción de 8 millones de toneladas, así mismo se ha observado que en los últimos años México ha aumentado la exportación de diferentes productos hortícola, siendo una de sus grandes ventajas su alta relación beneficio/costo.

En relación a los abonos orgánicos Ferreira y Santamaría (1997), propone el uso de tecnologías que devuelven al suelo el componente biológico perdido, como son las compostas

Trujillo (1997), señala que existe una preocupación sobre las consecuencias ecológicas que la agricultura moderna ha producido y que existen alternativas serias que favorecen la producción sin lateral el medio ambiente, con el uso en la agricultura de abonos orgánicos.

Gómez y Gómez (1996), indican que las técnicas de producción orgánica en México son variadas y dependen del cultivo, pero en general el objetivo fundamental es conservar el suelo, incrementar y combatir las plagas.

OBJETIVOS

- Evaluar la producción de lechuga con la aplicación de diferentes fertilizantes orgánicos en comparación con el testigo con aplicación de composta, bajo condiciones de invernadero.
- Obtener información sobre los fertilizantes orgánicos, procurando que sean los más indicados y los más rentables.
- Contar con información sobre las mejores opciones en el cultivo de lechuga con la aplicación de fertilizantes orgánicos.
- Mejorar la calidad del suelo y reducir la contaminación del ambiente con la aplicación de fertilizantes orgánicos, bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se inició con el establecimiento de la parcela con la aplicación de diferentes fertilizantes orgánicos bajo condiciones de invernadero, este se realizó en los invernaderos del Centro Universitario de los Altos perteneciente a la U de G, ubicado en el Municipio de Tepatitlán de Morelos Jalisco, de acuerdo al calendario de siembras establecido,

TRATAMIENTOS

Los tratamientos y dosis a utilizar fueron

- 1.- BIO-FOM* polvo a la siembra, más 3 foliares BIO-FOM
- 2.- BIO-FOM *polvo a la siembra, más 3 foliares BIO-FOM
- 3.- BIO-FOM* polvo a la siembra, más 3 foliares BIO-FOM
- 4.- BIO-FOM* polvo a la siembra, más 3 foliares METASOLATE
- 5.- BIO-FOM* polvo a la siembra, más 3 foliares BIO-FOM
- 6.- Testigo con aplicación de composta

Las parcelas constaron de 23 bolsas de plástico, colocando las semillas a una distancia de 30 cm entre planta y planta.

Todos los tratamientos excepto el testigo se iniciaron aplicando el BIO-FOM polvo a la siembra a una dosis de 1 ton/ha, 100 grs por planta y posteriormente se realizaron 5 aplicaciones con fertilizantes foliares, con BIO-FOM líquido, 50 ml/parcela, a los 8, 15, 25, 32 y 40 días después de la siembra. Las variables a medir fueron

- Rendimiento por/ha
- Calidad de fruto**
- Tamaño de raíz
- Sanidad de planta

Se observó que en la primera fertilización foliar después de la siembra, los tratamientos 4 y 5 afectaron y dañaron las plantas, por lo cual se redujo la dosis a 40m/ planta en las siguientes aplicaciones de fertilización foliar.

RESULTADOS

Se cosechó la lechuga pesando 8 plantas individualmente de cada parcela/tratamiento obteniendo los siguientes resultados en grs.

Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	Promedio
1	540	400	420	440	340	500	500	480	452
2	440	350	600	380	580	580	480	460	484
3	400	670	350	340	400	360	460	300	410
4	240	380	540	560	520	440	518	460	457
5	560	440	480	480	580	560	430	510	505
6	235	304	425	310	380	348	350	287	304

Cuadro. 1 Promedio peso en grs de 8 plantas de lechuga

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados podemos observar que los tratamientos que presentan mejores rendimientos son el tratamiento 5 BIOFOM polvo más foliar BF-1, seguido del tratamiento 2 BIOFOM polvo más foliar BF-2, los cuales superan al resto de tratamientos, así mismo se puede observar que todos los tratamientos probados superan al testigo, al cual solo se le aplicó composta.

En relación a tamaño y forma de raíz los tratamientos 2 y 3 fueron los que presentaron raíz más vigorosa.

BIBLIOGRAFIA

1. Araní, C, M. (2005). Influencia de la densidad de plantas y de la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo en el cultivo de Cedron Paraguay (*Lippia citriodora* L.) en el segundo año. San Pedro de Ycuamandyyu: Paraguay.
2. Bravo, L. A. G. y García S. J. A. (2000). El acolchado del suelo, un equipo práctico para realizarlo. 500 Tecnologías Lave en Mano. INIFAP, SAGAR. Serie 2000 Tomo II. pág.73
3. Calzada, M. (2003). Tendencias del mercado orgánico mundial. Oportunidades para Latinoamérica, CD Mov. Arg. Prod. Orgánica (MAPO).
4. Cámara de Comercio. Centro de Comercio Internacional (UNCTAD/OMC). (2001). Los mercados mundiales de frutas y verduras orgánicas. Netherlands. FAO. 4-10 p.
5. Cruz, V. A. (2000). Riego por goteo para el cultivo de chile seco en Zacatecas. 500 Tecnologías Lave en Mano.
6. INIFAP, SAGAR. Serie 2000 Tomo II. pág. 170-171. García, S. J. A & Madrid, C. M. (2000). Uso de plástico en hortalizas. 500 Tecnologías Lave en Mano.
7. Mirafuentes, H. F. (2000). Control de virosis en chile jalapeño y habanero con acolchado. 500 Tecnologías Lave en Mano. INIFAP, SAGAR. Serie 2000 Tomo II. Pág. 73
8. Nava P. R. (2000). Como evaluar el rendimiento de chile habanero y aprovechar mejor el sistema de riego por cintilla. 500 Tecnología Lave en Mano.

9. Orellana, B, F. E. (1997). Efecto de dos abonos orgánicos y tres niveles de fertilización química en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Buenavista: Saltillo Coahuila (México).
10. Rendón, V. D. (1997). Sinaloa. Una versión de futuro. Centro de Estudios Estratégicos. ITESM. Culiacán, México. Pp. 171-183

ANÁLISIS DEL USO Y DEL APROVECHAMIENTO DE CAMA UTILIZADA POR HÁMSTER SIRIO DORADO.

Nayelit Licona Osnaya¹, Alma Brenda Vicuña Guerrero², Bárbara Vargas Miranda³
Alfredo Trejo Córdova⁴, María del Carmen Navarro Maldonado⁵, Demetrio Alonso Ambríz García⁶

¹Licenciatura en Biología, ²Licenciatura en Producción Animal, ³Departamento de Ciencias de la Salud,^{4,5,6}Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa¹ correo electrónico: deme@xanum.uam.mx

RESUMEN

Un bioterio requiere de cama o lecho donde los animales (roedores) vivan, a base de fibras de madera aislante, térmica y absorbente. Los animales despliegan conductas sobre esta cama, tales como: rascado, construcción del nido, delimitación del área húmeda y seca, almacenamiento de alimento o restos corporales. El presente estudio tuvo por objetivo conocer las particularidades físicas y de utilización de la cama (Bioinvert) en hámsteres del bioterio de la UAM-Iztapalapa, y su aprovechamiento en bocashi. Se cuantificó la capacidad higroscópica máxima por saturación de humedad, la capacidad de evapotranspiración en incubación a 40°C, se caracterizó la utilización de la cama en cajas de diferente tamaño y con diferente número de animales. Finalmente se aprovechó la cama por compostaje de rápida velocidad o bocashi (5kg de cama sucia, 3kg de tierra, 0.5kg de carbón vegetal, 0.2kg de ceniza, 5gr de levadura y 80ml de melaza). Se encontró que la capacidad higroscópica máxima es de 2.04 veces la masa de la cama. La evapotranspiración depende de la saturación de humedad, así, 50% (en relación al peso de la cama) es de 15 minutos, al 100% de 25 minutos y al 200% es de 24 horas. La utilización de la cama depende del tamaño de la caja, del número de individuos y frecuencia de cambio, de modo que la excreta se coloca aleatoriamente, eligiendo una esquina para el área húmeda. Si es ocupada por uno o dos animales construirán nido, pero a mayor población no lo harán. El área húmeda se mantiene, a pesar de rotar la caja o cambiar de posición el bebedero. El bocashi degradó los materiales en 15 días y se dio una semana más de reposo para su aplicación en jardinería. Se concluye que el conocimiento físico de la cama puede mejorar su aprovechamiento.

INTRODUCCIÓN

Un bioterio es una instalación para mantener en las mejores condiciones posibles a animales que serán utilizados para investigación. Como parte importante de sus cuidados de higiene es la provisión de cama sanitaria la cual es de material aislante térmico además de altamente absorbente, considerando que permanecerá durante varios días en el piso de la caja para recibir la orina y excreta de los animales (Ahn *et al.*, 2016). Con respecto a la orina, el grosor proporcionado de la cama procurará llevar a la parte inferior de la misma la humedad evitando con ello daño a la piel de los animales. Claro es que esta cama deberá cambiarse periódicamente así como que las cajas deberán ser lavadas. Dicho cambio de cama sanitaria dependerá también de las condiciones ambiente del bioterio dado que si bien la cama recibe la humedad de la orina también va evaporando y liberando amoníaco. Además su cambio dependerá de la capacidad de carga o densidad poblacional que tenga la caja, edad de los animales y su estado fisiológico, por ejemplo animales diabetizados rápidamente humedecen la cama y requerirán el cambio con mayor frecuencia.

La cama seca también es útil para el despliegue de patrones conductuales complejos de los animales, los cuales son básicamente roedores (rata, ratón y hámster), y les permita rascar, la construcción de nido y utilización para esconder alimento o restos corporales de animales muertos o canibalizados.

En la cama también se conserva alimento que a la acción de roer va convirtiéndose en polvillo o pequeñas partículas de difícil manipulación por los animales.

Los roedores dividen el área cubierta de cama de la cual disponen en área húmeda y seca. En la primera se deposita la orina y en la segunda sirve para descanso y otras conductas. Sin embargo en ambas áreas se utilizan para la defecación. Dado que la excreta es firme y seca, no incomoda a los animales que en sus áreas secas realicen otro tipo de conductas.

Una vez cambiada la cama sucia y húmeda, se deposita en bolsas para sacarla del bioterio, siendo el destino más común el envío a los desechos sólidos. Este cama sanitaria puede llegar a convertirse en un recurso si aplicamos procedimientos para aprovecharla tales como composteo (normal y bocashi o de alta velocidad). Posteriormente este material puede ser aprovechado en jardinería de la propia institución o en procesos agrícolas tales como cultivo de hortalizas y frutales.

Existen diferentes tipos de materiales de cama sanitaria siendo los más comunes en nuestro medio los que utilizan como materia prima la viruta de madera (pino, oyamel, ocote) la cual es procesada para disminuir el tamaño de partícula (0.5 mm) y esterilizarla. Este último proceso es fundamental porque de otro modo resulta frecuente la contaminación con ectoparásitos (pulgas y piojos) así como bacterias y virus, que pondrían en un alto riesgo a las poblaciones animales del bioterio (Ahn *et al.*, 2016).

Existen además en el mercado otro tipo de materiales altamente recomendables por su gran capacidad de higroscopicidad y de liberación continua de humedad al ambiente así como confortables y seguras para los animales, lamentablemente por sus costos elevados hacen limitado su acceso.

Por otro lado las Instituciones de Educación Superior en nuestro país desde hace tiempo tienden hacia programas de sustentabilidad donde reduzcan la producción de residuos sólidos y aumenten su clasificación y en su caso, su aprovechamiento. Así los residuos de jardinería, residuos de cafetería y muchos más, podrían en un momento ser clasificados y aprovechados para su uso directo o incluso comercializados en volumen.

El presente trabajo fue realizado con el objetivo de cuantificar, caracterizar y aprovechar la cama sanitaria sucia del bioterio de la UAM Iztapalapa, a través de procesos de composteo por bocashi.



Fig 1. Hembra con crías sobre la cama de viruta.

MATERIAL Y MÉTODO

Análisis microscópico.

Se colocó 0.5 gr de una muestra homogénea de cama sanitaria limpia, en una caja Petri y se observó directamente al microscopio estereoscópico con lentilla graduada, describiendo a las partículas en forma y tamaño.

Capacidad higroscópica

Se pesaron vasos de precipitado de 150 ml en una báscula digital. Se llenaron con 5 gr de cama sanitaria homogénea limpia y 50 gr de agua. Se dejaron en reposo durante 10 minutos. Se retiró el excedente de agua volteando los vasos de precipitado sobre coladeras. Se pesó el agua vertida. Se pesó la cama humedecida en el vaso de precipitado y por diferencia de peso inicial se calculó el peso de cama y agua retenida. Finalmente se calculó la capacidad de retención de agua (higroscopicidad) como el peso húmedo en relación al peso seco de la cama sanitaria.

Capacidad de evapotranspiración.

Se colocaron muestras de cama sanitaria de 2 gr con 1, 2 o 4 gr de agua en cajas Petri, se pesaron y se introdujeron a una estufa de secado a 30°C que es la temperatura estimada que disipa un

hámster hacia la cama. Se sacaron y pesaron a las 15, 25 min y 24 horas. Por diferencia de peso se calculó la evapotranspiración en las horas mencionadas.

Caracterización de utilización de la cama.

Se seleccionaron cajas de hámsteres con densidad poblacional alta. En cajas chicas 3 individuos y en medianas 7 individuos, se les cambió la cama sanitaria a las 8 am. Se observó la cantidad y distribución de las excretas a 1, 3 y 24 horas. Se observó la relación de éstas con el área húmeda y con la caída del bebedero. Para ello se diseñó un dispositivo que permitió sostener en alto la caja y debajo de ella un espejo inclinado para visualizar de manera cómoda, el área inferior de la caja y de la cama.



Fig 2. Dispositivo empleado para análisis de uso la cama, vista inferior.

Cuantificación semanal de producción de cama sanitaria sucia.

Se pesaron las bolsas con la cama sanitaria sucia los días lunes y jueves que es cuando se hace el cambio de cama del bioterio en una báscula digital de piso.

Producción de Composteo (bocashi). Se utilizó una mezcla conformada en proporción de 5 kg de cama sucia, 3 kg de tierra, 0.5 kg de carbón vegetal, 0.2 kg de ceniza, 5 gr de levadura y 80 ml de melaza, además se adicionó agua para que todos los materiales estuvieran suficientemente humedecidos. La cama, tierra, carbón y ceniza se mezclaron primeramente volteando de manera repetida con pala. La levadura, la melaza y el agua fueron mezcladas en un recipiente y agregadas de manera uniforme sobre la mezcla de materiales y se revolvió uniformemente. Todo este material fue colocado en un contenedor de acrílico y tapado con película plástica. Durante los siguientes 5 días se removió dos veces al día y durante 10 días siguientes, solo 1 vez al día, para que al cabo de 15 días el proceso haya concluido.

Análisis estadísticos.

Solo se trabajó estadística básica con medidas de tendencia central, puesto que en este momento el trabajo fue enfocado a la caracterización del uso y aprovechamiento de cama de animales de bioterio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al microscopio se evidenciaron las fibras celulares alargadas y rectangulares de la cama que permiten inferir que proceden de alguna conífera, Las fibras son de color amarillo brillante debido a la presencia de lignina, su grosor promedio fue de 0.5mm. El tamaño promedio de la partícula de viruta fue de 7mm por 0.5mm. Las hojuelas se encuentran curvadas lo que en conjunto confieren una propiedad de acolchado.

Al calcular la capacidad de retención de humedad en relación al peso seco de la viruta (higroscopicidad) se definió que fue de 1 a 2.04, es decir que por cada gramo de cama se retendrán hasta 2 gr de agua.

Cuadro 1. Capacidad de retención de agua (higroscopicidad) de cama.

Peso del Vaso (grs)	Vaso- viruta (grs)	más agua (grs)	Drenado (grs)	Retención (grs)	Relación (grs)
53	58	108	69	11	2.2
50	55	105	65	10	2
52	57	107	67	10	2
73	78	128	88	10	2
59	64	114	74	10	2

Promedio

.04

Este valor es inferior al reportado en la literatura por Ahn *et al*, 2016, quienes determinaron que la viruta de manera cuenta con una capacidad de absorción de agua del 519% es decir casi tres veces más que lo que encontramos en este trabajo (2.04 o 204%), lo anterior quizá debido a diferencias en la materia prima de origen y en método de procesamiento para cama de animales de bioferio y es mejor que la recomendada para camas nacionales por ejemplo con capacidad de retención de 150% y una capacidad de pérdida de amoniaco de 1.5 ppm en los primeros 20 minutos.

En cuanto a la evapotranspiración se encontró que adicionar 1 gr de agua a 2 gr de cama (relación 50% peso/peso) y calentarlo a 30°C durante 15 minutos se logró la total evapotranspiración (100%), sin embargo al colocar 2 o 4 gr (relación 100 o 200%) en ese mismo lapso de tiempo se logró apenas la pérdida de 1gr de agua, lo que representó el 50 y 25% respectivamente. Al calentar por 25 minutos se llegó a la pérdida del 100 y 50% respectivamente. Por último al calentar durante 24 horas la 2 gr cama que le fue añadido 4 gr de cama (relación 200%) se tuvo una pérdida del 100% (total) por evapotranspiración, como se puede ver en el cuadro 2. Además se conoce que el Índice de pérdida de agua en cama de bioferio colocada en el fondo de la caja y humedecida es de 30gr.

Cuadro 2. Capacidad de evapotranspiración de cama de bioferio a 30°C.

Caja Petri (grs)	Cama (grs)	Agua (grs)	Final (grs)	15 min	Déficit (grs)	25 min	Déficit (grs)	24 hr	Déficit (grs)
5	2	1	8	7	1				
5	2	2	9	8	1	7	2		
5	2	4	11	10	1	9	2	7	4
6	2	1	9	8	1				
6	2	2	10	9	1	8	2		
6	2	4	12	11	1	10	2	8	4
6	2	1	9	8	1				
5	2	2	9	8	1	7	2		
6	2	4	12	11	1	10	2	8	4

En la caracterización de utilización de cama observada inmediatamente después a colocarla limpia, se evidenció que la deposición de excretas es por toda la superficie. Al cuantificar el peso de la cama seca y el de la cama húmeda el día del cambio establecido en el bioferio, se vio que la cama es cambiada con apenas el 50% de su capacidad de retención de humedad.

El área húmeda que establecieron dentro de la caja y en uso particular de la cama, se estableció en el lado opuesto de la zona donde la rejilla contiene el alimento. Se procedió a cambiar de orientación las tapas-rejilla para conocer si los animales reorientaban el área húmeda ya inicialmente establecida lo que no ocurrió. Es posible que el establecimiento del área húmeda en la parte opuesta al comedero obedezca también a que es la zona más segura por estar en el lado opuesto al pasillo y el animal en

ese acto fisiológico se perciba vulnerable a diferencia de la excreta que la deposita en cualquier sitio y en marcha, sin embargo una vez establecida el área húmeda no la modifican a pesar de colocarla en la parte frontal de las cajas cerca del pasillo (Gutiérrez y Contreras, 2002).

Una vez que los animales definen su área húmeda, el orín escurre a través de esta área que normalmente es en una esquina posterior, humedeciendo la cama inferior hasta la mitad de la caja. Es importante señalar que entre mayor sea el número de individuos en la caja la utilización de la cama varía considerablemente. Por ejemplo, cuando solo hay de uno a tres ejemplares, es frecuente encontrar la presencia de nidos o montículos de cama con una oquedad central y alejados del área húmeda, cuando se sobrepasa el número de individuos no hay construcción de nidos, así como también se pueden encontrar dos o tres áreas húmedas en áreas cercanas. Al respecto no se encontró bibliografía relacionada pero consideramos que es de importancia puesto que nos indica no solo una conducta de los individuos sino la posibilidad de mejor utilización de la cama en beneficio de los animales y de la economía del bioterio. Existen otras variables relacionadas como por ejemplo el sexo de los individuos, así como la etapa del ciclo estral, la edad, por ejemplo en neonatos la orina y excreta es consumida por la madre hasta el día 10 de vida y posteriormente los jóvenes, dado su alto metabolismo tienden a tener mayores episodios de micción, importa también el nivel de manejo y de estrés al que están sometidos. En el presente trabajo se encontró menor micción en los momentos de menor flujo de usuarios dentro del bioterio como por ejemplo fines de semana. Después de un día, la orina que solo se aprecia como humedad en la cama, comienza a tornarse de color blanquecina y a los días siguientes se aprecia un color marrón, lo cual indica la ocurrencia de reacciones químicas entre la orina y los componentes de la cama de viruta. Al respecto algunos productores de cama para bioterio prefieren fabricarlas a partir de maderas duras de las especies Aspen y Arce, que además son libres de endotoxinas propias de las maderas blandas además de estar libres de alquitranes y aflatoxinas además se han cuantificado y comprobado que hay muy bajo conteo de metales pesados, pesticidas, organoclorados y fosforados.

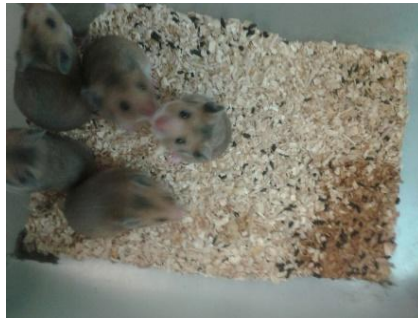


Fig 3. Demarcación de área húmeda en la esquina de la caja



Fig 4. Utilización de cama con formación de nido.

Cuantificación semanal de producción de cama

Se estimó que en un día de cambio normal de cama sucia se sacan 5 costales con un peso promedio de 25kg por cada uno. Esto es 10 costales por semana (250 kg) y en total 1000 kg por mes con una población fluctuante de alrededor de 400 ratones CD-1, 60 hámsteres Sirdio Dorado y 600 ratas Wistar.

Producción de bocashi.

Para la elaboración de composta a alta velocidad (bocashi) no es recomendable la sola inclusión de material celulítico, pero si puede ser incluido como parte integral esperando la fermentación de la excreta y orina que contiene, además ayuda como material absorbente del lixiviado de los componentes a degradar.

El bocashi es un abono orgánico de rápida preparación, por eso el nombre, porque en japonés significa abono orgánico de rápida descomposición.

Los abonos orgánicos tienen una gran importancia ya que tienen como objetivo aumentar la cantidad de microorganismos benéficos en el suelo y matar los patógenos, además de dar nutrientes de forma rápida a la planta, siendo esto de gran importancia para la agricultura. Existe una gran diversidad de abonos orgánicos, entre los que sobresale el bocashi debido a sus ventajas y rapidez en la elaboración, sin embargo hay que tener cuidado en su utilización en el campo ya que por ser un abono "inmaduro" o en proceso de fermentación puede afectar a las plantas con el contacto directo, por este motivo, con este trabajo también se pretende dar una guía para su elaboración y uso, pues no tiene receta fija, aunque la calidad de un abono orgánico lo determina el material a partir del cual se elaboró, lo importante es tener los materiales disponibles en el sitio y buscar materiales alternativos que se puedan encontrar en la zona de trabajo para su elaboración; informándose con anticipación que beneficio traería su utilización de cada ingrediente para dicha actividad. La temperatura inicial que alcanza la mezcla ronda cerca de los 75°C desprendiéndose los primeros días una cantidad importante de amoníaco que permanece durante 5 días. La levadura junto con la melaza genera gran cantidad de calor que acelera el proceso de fermentación de los demás componentes en este tipo de composteo (López-Martínez *et al.*, 2001).

Al término de los 15 días, se descubrió y se dejó orear por un par de días para realizar la prueba del puño consistente en sujetar en una mano y apretar el bocashi para evidenciar que no escurre lixiviado pero además que la materia permanece compactada al abrir la mano, señal que el proceso ha concluido satisfactoriamente.



Fig 5. Composteo a alta velocidad de cama de bioterio.



Fig 6. Composta tipo bokashi terminada en 15 días de proceso.

CONCLUSIONES

Se caracterizó microscópicamente la cama utilizada para animales de bioterio así como sus propiedades de higroscopicidad y evapotranspiración. Se conoció que la dinámica que establecen los animales con este elemento es sumamente variable pues es en gran medida su entorno, ocupándola de diferentes maneras para descanso, entretención y para alojar sus desechos y finalmente se obtuvo un producto transformado (bokashi) de gran utilidad en la jardinería, con ello nuestra Institución tenderá hacia la sustentabilidad en esta área.

BIBLIOGRAFÍA

1. G., Ahn Jang S., Kwak H., Lee S., Oh Y., y Park K. 2016. Characteristics of Rice Hulls, Sawdust, Wood Shavings and Mixture of Sawdust and Wood Shavings, and Their Usefulness According to the Pen Location for Hanwoo Cattle. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 29 (4): 599-605.
2. J. D. López-Mtz., A. Díaz Estrada, E Martínez Rubin y R D. Valdez Cepeda. 2001. Abonos orgánicos y sus efectos en las propiedades físicas y químicas del suelo y rendimiento del maíz. *Terra* 19:293-9.
3. A. Gutiérrez-García, Contreras M. 2002. Algunos aspectos etológicos de la comunicación química en ratas y ratones de laboratorio. *Rev Biomed* 2002. 13:189-209.
4. S. Komar, R. Miskewitz, M. Westendorf, C. Williams C. 2015. Effects of bedding type on compost quality of equine stall waste: Implications for small horse farm. *J. Anim. Sci.* 2012. 90:1069–1075
5. J. Polop, J. Priotto, A. Steinmann, C. Provencal, E. Castillo, G. Calderón, D: Enría, M. Sabattini y H. Coto. 2003. Manual de control de roedores en municipios. Universidad Nacional de Río Cuarto. Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Grupo de Investigación en Ecología de Poblaciones (GIEP). Pp 12.
6. I. Ramírez-Sánchez, M. Rios-Solis, M. Morales-Contreras, F. Colomer-Mendoza, J. Vargas-Soto, y F. Robles-Martínez. 2016. Uso de viruta de madera y lirio acuático (*Eichhornia Crassipes*) como agentes estructurantes en tratamientos aerobios. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 32:153-160.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CAMPO ELÉCTRICO SOBRE PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIOXIDANTES DE FRUTOS ROJOS

María Reyna Robles López¹, Elizabeth Pérez Conde², Raúl René Robles de la Torre¹

¹ Instituto Politécnico Nacional CIBA-IPN, ² Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala.

RESUMEN

La conservación de alimentos ha sido una constante necesidad de los seres humanos desde su origen, desde esa época fueron surgieron diversos métodos de conservación, destacando los tratamientos térmicos, como la pasteurización y la cocción, enlatado, secado en hornos, etc., con ellos ha sido posible prolongar la vida útil de los alimentos, aunque alterando las características fisicoquímicas. En la actualidad se busca conservar alimentos alterando lo mínimo las cualidades nutracéuticas, debido a ello surgieron las “Tecnologías Emergentes”, conocidas también como “Tecnologías no Térmicas”. En el CIBA-IPN se analiza el efecto del campo Eléctrico (CE) sobre la disminución de carga microbiana y la inhibición de enzimas que pudieran ocasionar deterioro en los alimentos durante su almacenado, así como mejorar operaciones unitarias como secado y extracción. En el presente trabajo se planeó estudiar el efecto del CE sobre fresas, zarzamoras y frambuesas, por ser frutos de corta vida poscosecha y por sus características sensoriales y antioxidantes, se aplicó un diseño experimental ²² con tres repeticiones para cada fruto tomando en cuenta que por cada tratamiento se tuviera un número de frutos suficiente para realizar muestreos: inicial, a los 5, 10, 15, y 20 días posteriores a los tratamientos. Los tratamientos fueron con intensidad del campo constante de 4.5 kV/cm, tiempo de exposición de 20 y 30 min y la frecuencia de 0 y 500 Hz, estas condiciones tuvieron como base resultados anteriores, los controles se expusieron en la celda de tratamiento sin aplicar el campo eléctrico pero si considerando el tiempo de exposición.

Las variables de respuesta fueron la capacidad antioxidante, con el método de fenoles totales y DPPH, el color fue cuantificado en espectrofotómetro disolviendo en agua una porción constante del fruto y realizando lecturas en espectrofotómetro con diferente longitud de onda de acuerdo a cada fruto, la pérdida de peso se cuantificó por gravimetría, y por características físicas para considerar si el fruto era aún útil o presentaba signos de pudrición o contaminación, o deshidratación.

De los resultados se puede concluir que el Campo Eléctrico si afecta la vida útil de los frutos frescos, por lo que esta tecnología al ser de fácil aplicación, económica, no contaminante, y sin incrementos de temperatura en los productos tratados, se puede aplicar pos cosecha como método combinado con refrigeración, pero es necesario evaluar el uso de esta tecnología para diferentes frutos pues depende del tamaño, estado de maduración, composición, y contaminación inicial etc.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los alimentos son altamente perecederos debido principalmente a su elevada actividad de agua, A_w y a los nutrientes contenidos en ellos, por lo que históricamente se han desarrollado métodos que permiten conservarlos por tiempos más prolongados. Uno de los efectos más estudiados es la aplicación de calor, con el cual se logra desnaturalizar enzimas, disminuir el microbioma y disminuir el agua disponible; aunque el calor usado conlleva también cambios en las características organolépticas.

Desde los últimos años del siglo XX a la fecha se han estado buscando otras tecnologías que permitan conservar también las características nutraceúicas de los alimentos, en el caso de frutos, mantener el color, el sabor, sus antioxidantes y vitaminas; y han surgido tecnologías denominadas “emergentes”, algunas de ellas conocidas también como tecnologías “no térmicas”. Entre estas destacan las altas presiones (AP), el campo eléctrico pulsado (CEP) y el campo eléctrico (CE).

En este trabajo de investigación se buscó la respuesta al CE de frutos rojos, como fresa, frambuesas y zarzamoras, porque son frutos de alto valor comercial, de vida útil corta y por ser frutos cuyas cualidades sensoriales en fresco son excepcionales; además SAGARPA en su planificación agrícola nacional, coloca a los arándanos, frambuesas y zarzamoras, con un alto potencial por la demanda internacional y la posibilidad de que México pueda expandir su área de siembra. (Planeación Agrícola Nacional.2017-2030).

Es conocido el deterioro que sufren los frutos por el crecimiento superficial de hongos, que producen ennegrecimiento de los tejidos, podredumbre marrón, azul, rosada y gris, las frutas se hacen más

susceptibles conforme maduran, ya que disminuye la producción de componentes antifúngicas, también se degradan las paredes celulares y provocan suavidad en los tejidos.

En la clasificación de “frutos rojos, frutillas o frutos del bosque”, se incluyen diversas frutas de varios grupos botánicos, la mayoría son pequeñas, jugosas, aciduladas y dulces de color muy llamativo. En condiciones silvestres se producen por un corto periodo en verano, son de corta vida de anaquel, antiguamente se cosechaban por determinado tiempo para el consumo en fresco y elaborar algunas conservas. Entre los frutos rojos más importantes en la producción mundial se encuentra la fresa con el 66% de la producción total le siguen las frambuesas y zarzamoras, las de menor producción se encuentran las moras y grosellas con un 5 y 2% en producción, (Figura1). (SAGARPA, 2012).

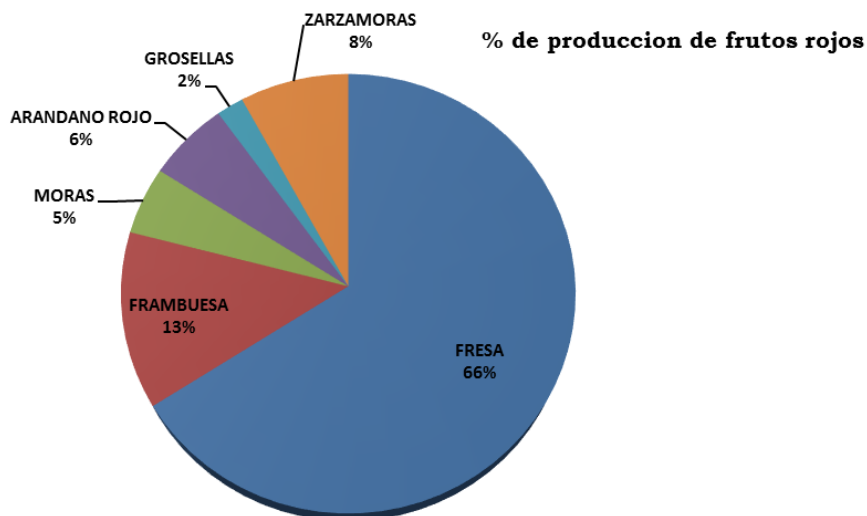


Figura 1. Producción mundial de frutos rojos
Fuente: (SAGARPA, 2012)

Los frutos rojos contienen pigmentos con actividad antioxidante, los principales pigmentos encontrados son los flavonoides, antocianinas y taninos, se ha reportado que algunos de estos compuestos actúan como antioxidantes ya que tienen la capacidad de absorber radicales libres.

Las frutas rojas y bayas como las fresas, frambuesas, arándanos y zarzamoras son consumidos a nivel mundial en fresco y en forma de productos procesados tales como zumos, confituras, frutas desecadas, helados, etc. Algunos frutos con antocianinas y fenoles se describen en la Tabla1.

Tabla 1. Contenido de antocianinas y compuestos fenólicos totales de algunas especies de frutillas

Frutilla	Antocianinas (mg/100 g)	Fenoles totales** (mg EAG/100 g)
Arándano	18-327	77-585
Arándano rojo	9	78
Frambuesa morada	5-197	267-512
Frambuesa roja	3-140	192-2116
Fresa	24-84	16-280
Grosella roja	16-36	207-418
Uva	156.9	475
Zarzamora	66-256	417-2349

Fuente. (Cuervas, 2011)

La frambuesa roja o fresa del bosque (*Rubus idaeus*) es el fruto del frambueso, un arbusto perenne de la familia de las Rosáceas, con ramas provistas de espinas, que crece en regiones templadas. Es un fruto compuesto por una serie de frutos pequeños, unidos entre sí y adheridos a un receptáculo

llamado hipando, por esta característica es un fruto delicado. Es un fruto no climatérico que posee cantidades importantes de compuestos bioactivos como ácido elágico, elagitaninos, antocianinas, ácidos fenólicos y algunos otros flavonoides que, según la literatura, contribuyen a un bajo riesgo de contraer enfermedades crónicas degenerativas (Salinas, et al., 2009).

La zarzamora se clasifica taxonómicamente dentro del género *Rubus* y pertenece a la familia de las *Rosaceae*, del subgénero *Eubatus*, es una planta invasora de crecimiento rápido que también puede multiplicarse vegetativamente generando raíces desde sus ramas, los distintos tipos de plantas varían de rastreras a erectas y de perenes a caducifolias (Ibáñez, 2011). Las zarzamoras son frutos formados por muchas pequeñas drupas arracimadas y unidas entre sí, de color rojo tornándose negro al madurar. Contiene el 80% de agua, las principales vitaminas son la C, E y A, destaca en su composición su alto contenido de pigmentos que además de dar el color y sabor característico tiene acción antioxidante como antocianinas, ácido elágico y flavonoles. (Rodríguez, et al., 2010).

La fresa pertenece al género *Fragaria*, son plantas vivaces, herbáceas, de hojas con los bordes dentados, que pueden ser lampiñas o vellosas. Se trata de una planta perenne. Sus tallos son pequeños y cortos.

De estos frutos básicamente existen las mermeladas y algunos otros productos que se destacan porque en su elaboración existe una aplicación excesiva de energía térmica o calor, lo que destruye en gran medida su riqueza nutraceútica y altera su textura. Algunas otras tecnologías de conservación implican el uso de compuestos químicos denominados *aditivos* con los cuales es posible disminuir la carga bacteriana o inhibirla, modificar su textura, color olor, etc., sin embargo, los consumidores buscan cada vez más alimentos mínimamente procesados, sin aditivos que puedan causar algún daño a la salud y productos lo más cercano a su origen natural.

Efectivamente, de estos frutos rojos sabemos de su riqueza en el contenido de antioxidante pero también de sus características generales, como su elevada actividad de agua (A_w), lo que les da una vida útil muy corta. Por todo lo anterior se pensó en aplicar otras tecnologías que permitan conservarlos por más tiempo sin recurrir al aditivos químicos y sin alterar drásticamente las características originales de las frutas. Como ya se comentó, desde los años 90's han surgido algunas tecnologías *emergentes*, aparte de las ya mencionadas, están también el calentamiento óhmico (CO), campos magnéticos oscilantes (CMO), descargas eléctricas (DE), o la exposición a microondas (MO) ultrasonido (US), estos son algunos de los métodos con los que se ha logrado incrementar la vida útil de algunos alimentos. El objetivo de todas ellas es reducir el deterioro enzimático y reducir la carga microbiana.

Por lo anterior, el uso del Campo Eléctrico puede ser una tecnología que permita incrementar la vida útil de frutos con un deterioro mínimo de sus atributos y sin el uso de conservadores adicionados. El campo eléctrico se puede definir como el espacio perturbado por las cargas eléctricas, esta fuerza la puede experimentar una unidad de carga situada en el espacio formado por los electrodos. (Ariza, 2010). Además, si se combina el tratamiento de CE con el almacenado en refrigeración será posible extender la vida útil de estos frutos por tiempos prolongados. El presente trabajo se plantea la hipótesis de que por medio del tratamiento de campo eléctrico es posible conservar las propiedades antioxidantes y coloración de los frutos rojos, al mismo tiempo disminuir la carga microbiana para prolongar su vida útil, sin efectos colaterales en los frutos y que estos beneficios podrán extenderse con el uso de la refrigeración.

TEORÍA

Con diversos trabajos de investigación desarrollados en el CIBA-IPN, por ejemplo, se ha demostrado el efecto del CE sobre la disminución de carga microbiana en un cultivo puro de *Listeria innocua*, se evaluó el efecto sobre la enzima poli-fenol-oxidasas del aguacate sobre el oscurecimiento de la pulpa tratada, el campo eléctrico inhibe la acción de la enzima PFO y prolonga su vida útil, también se ha demostrado la modificación de estructuras proteicas, todo ellos sin la aplicación de energía térmica. Estas investigaciones se llevaron a cabo con el equipo, diseñado y construido en el CIBA-IPN y cuyo diagrama y elementos principales se muestran en la Figura 2.

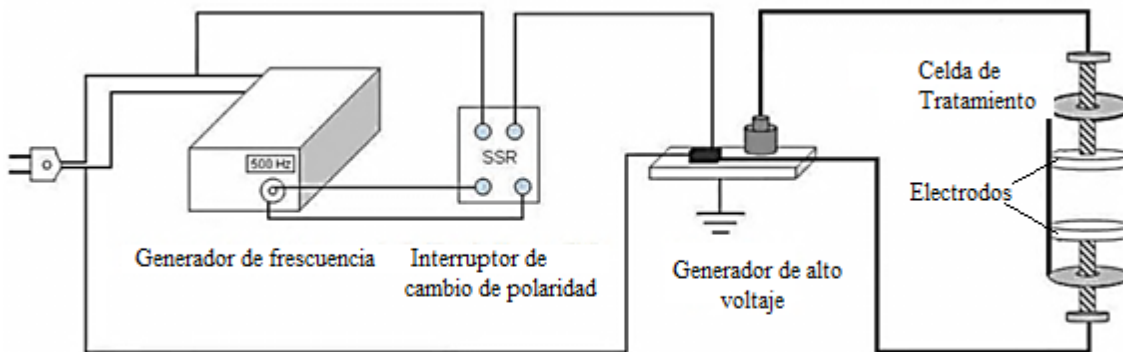


Figura 2. Diagrama del equipo de CEP-IPN.

La tecnología que nos ocupa en el presente trabajo es la aplicación de un Campo Eléctrico (CE), el cual se puede definir como la exposición de un material a un campo de fuerza generado entre dos polos o electrodos donde se coloca el alimento a tratar, la fuerza del campo eléctrico dependerá de la carga que lo crea y la distancia entre los electrodos, la carga que lo crea está dada por la intensidad del voltaje que se aplique a los electrodos. Al no existir contacto entre alimento y electrodos, no hay continuidad y no hay flujo de corriente y por lo tanto esta tecnología no implica incrementos de temperatura en el producto, de aquí el nombre de tecnología no-térmica; el principio de acción del campo eléctrico es que éste desestabiliza algunas moléculas presentes en el producto que esté en medio de los electrodos, sobre todo moléculas que de por sí tengan alguna carga eléctrica, y todas las proteínas funcionales que estén alejadas de su punto isoeléctrico tienen cargas positivas y/o negativas, al final, esa atracción o repulsión de cargas por parte del campo es lo que determina la desestabilización de las proteínas, y ésta es la que contribuye a la inactivación enzimática.

En el caso de los microorganismos se aplica un mecanismo semejante sobre las proteínas que están localizadas en la membrana celular y esta desestabilización provoca la formación de poros en la membrana y según su intensidad puede inactivar microorganismos o solo inhibirlos. Esto último es la base de la *electroporación*, técnica que ahora se aplica de manera rutinaria en los laboratorios de biología molecular para intercambiar materia entre el exterior y el interior de una célula. Esta última parte, la formación de poros, es lo que se trata de aprovechar en el presente trabajo y es lo que en muchas partes del mundo están investigando (Vorobiev, 2006), con objeto de mejorar operaciones unitarias como secado y extracción sólido-líquido.

PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, unidad Tlaxcala del Instituto Politécnico Nacional, (CIBA –IPN Tlaxcala). Las condiciones de tratamiento fueron establecidas según la experiencia de los autores. El diseño experimental fue dos tiempos de exposición, 20 y 30 min, voltaje constante de 4.5 kV/cm y dos frecuencias de 500 Hz y sin frecuencia, todo ello sobre frutos completos. La intensidad del campo eléctrico se define por la ecuación 2, según sea la distancia de los electrodos, mientras que la frecuencia mide la frecuencia de cambio de polaridad entre los electrodos.

$$4.5 \text{ kV/cm} = \frac{\text{kV equipo}}{\text{cm entre electrodos}} \quad 1$$

$$\text{kV equipo} = (4.5 \text{ kV/cm})(\text{cm entre electrodos}) \quad 2$$

Cada muestra se coloca en una caja Petri, la cual se pone entre los electrodos del equipo. Se establecen las condiciones establecidas y se enciende el equipo y se inicia a contar el tiempo de exposición definido. En la Figura 3 se muestran las fotografías de los componentes del equipo.



Figura 3. Fotografías del equipo de CE-IPN

Posterior a los tratamientos, todos los frutos se guardaron en refrigeración en cajas de Petri estériles, y los muestreos para la cuantificación de los diferentes parámetros que se evaluaron, se realizaron de acuerdo con los siguientes diagramas.

Diagrama para cuantificar la actividad antioxidante y fenoles totales.

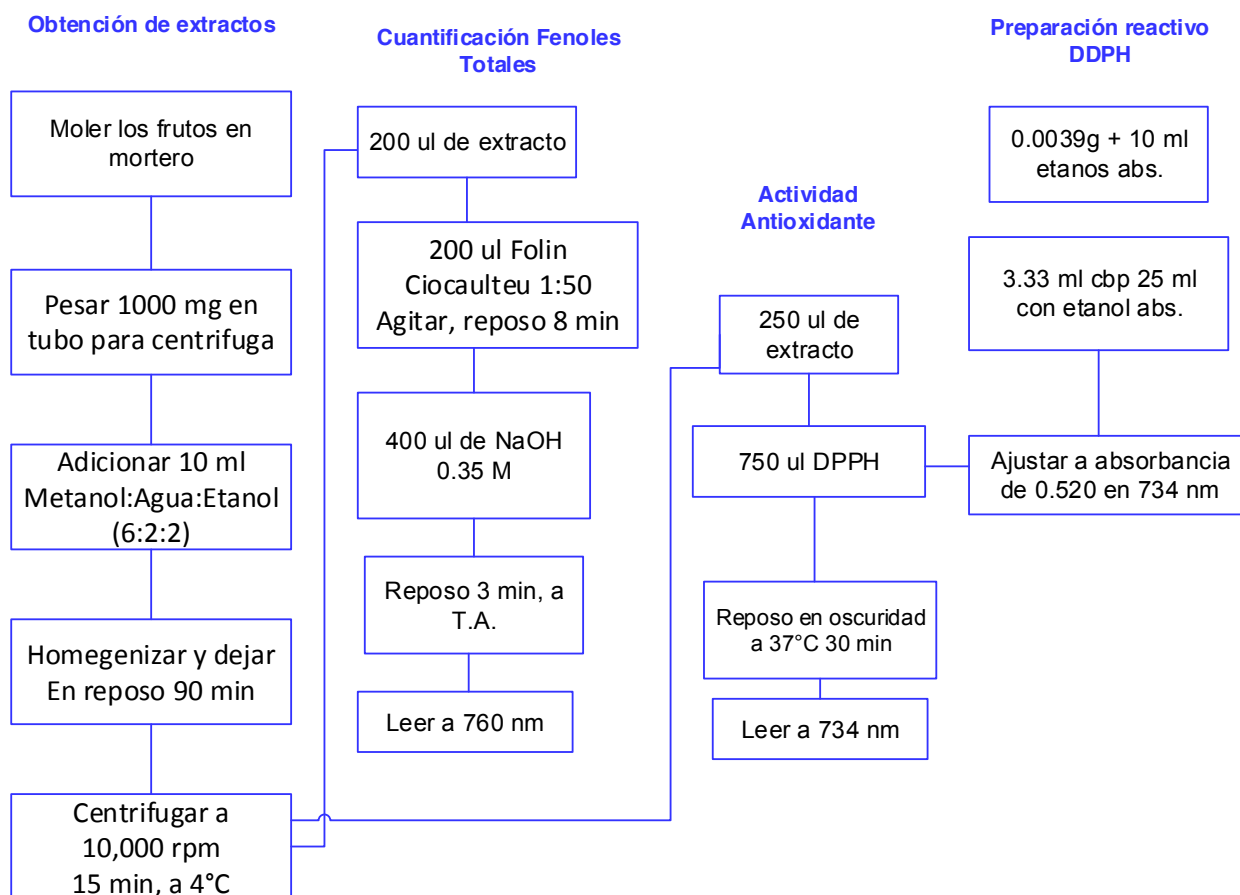
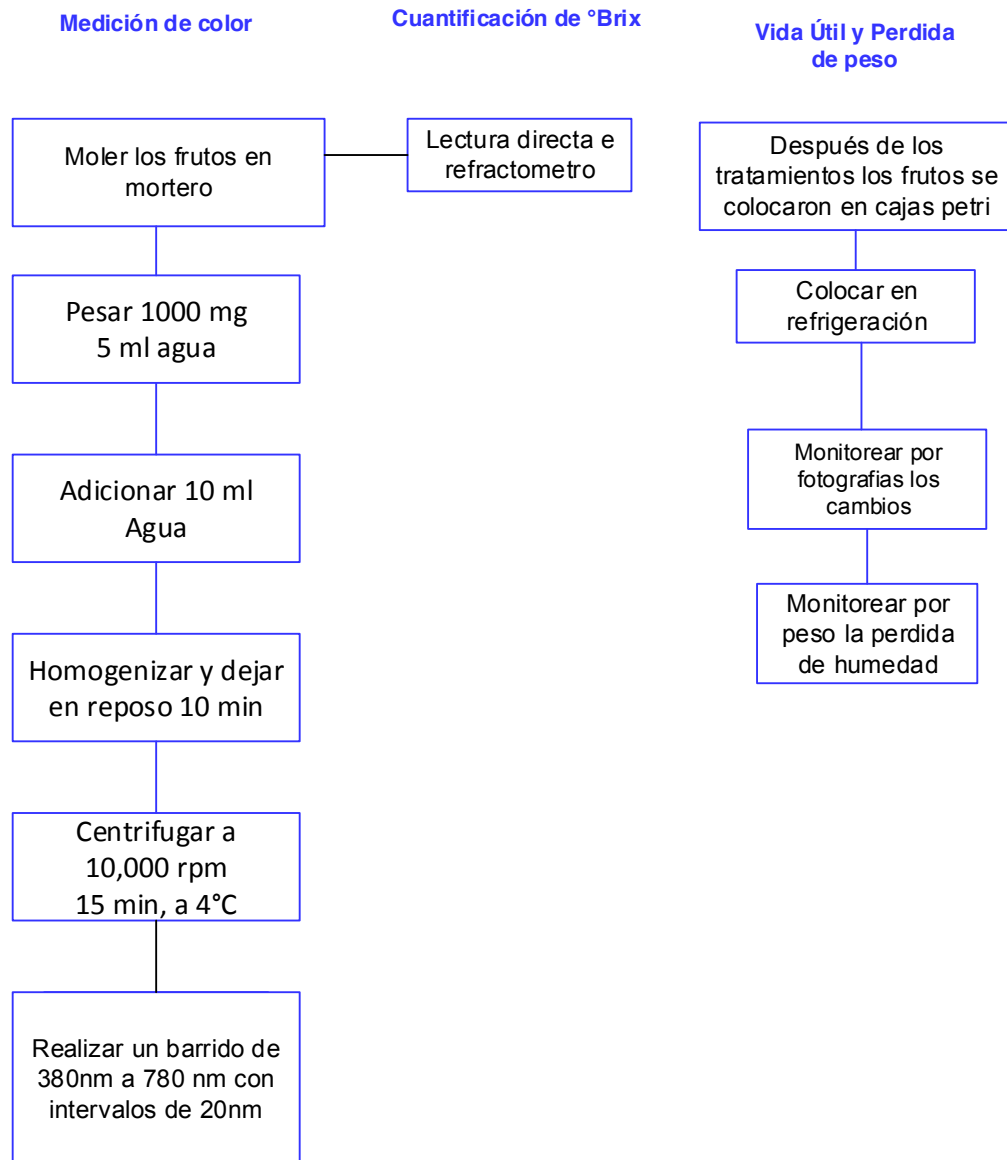


Diagrama para la cuantificación de parámetros físicos, y vida útil.



RESULTADOS

Se presentan los datos obtenidos de cuantificación de la capacidad antioxidante de los tres frutos estudiados, en la tabla 1 para Fresa, tabla 2 para Frambuesa y la tabla 3 para Zarcamora. Donde se representan los valores promedio durante el tiempo de estudio y donde aún se encontraron en condiciones aptas para ser consumidas.

Tabla 2. Promedio de actividad antioxidante en equivalentes de Trolox de *Fresas*. ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$)

Día de cuantificación	Día 1	Día 6	Día 9	Día 13	Día 15	Día 20	% Incremento
Tratamiento							
Testigo	4232.5	5139.5	6682.3	4428.8	7093.8	5326.5	26
20 min 0 Hz	2792.5	3297.4	4428.8	4335.3	6747.8	8477.7	204
30 min 0 Hz	3821.0	4849.6	6486	6205.5	6121.3	8748.8	129
20 min 500 Hz	4541.0	4176.4	6551.4	8318.7	7748.3	7888.6	74
30 min 500 Hz	4129.6	4849.6	7103.1	7907.3	7065.7	7215.3	75

Tabla 3. Promedio de actividad antioxidante en equivalentes de Trolox de *Frambuesa*. ($\mu\text{mol ET}/100\text{g}$)

Día de cuantificación	Día 1	Día 6	Día 9	Día 13	Día 15	Día 20	Incremento %
Tratamiento							
Testigo	6196.6	5569.6	6934.8	5569.6	7729.6	7234	1
20 min 0 Hz	6766.5	4905.7	6906.8	4905.7	7963.4	6654.3	-2
30 min 0 Hz	6486	6448.6	5644.4	6448.6	7084.4	6962.9	7
20 min 500 Hz	6495.3	5737.9	7701.6	4840.3	6944.2	5766	-11
30 min 500 Hz	6009.1	4812.2	6962.9	6504.7	7935.3	5270.4	-12

Tabla 4. Promedio de actividad antioxidante en equivalentes de Trolox de *Zarzamora*. ($\mu\text{mol ET}/100\text{g}$)

Día de lectura	Día 1	Día 6	Día 9	Día 13	Día 15	Día 20	Incremento %
Tratamiento							
Testigo	5803.4	5700.5	5915.6	4933.8	5541.6	9328.6	61
20 min 0 Hz	6046.5	4943.1	5102.1	4681.3	5756.6	7112.5	18
30 min 0 Hz	5906.2	5878.2	5083.4	5120.8	7608.1	5709.9	-3
20 min 500 Hz	5607	5074	4896.4	4484.9	7206	4643.9	-17
30 min 500 Hz	6196.1	6046.5	5083.4	5242.3	6775.8	8290.6	34

En las tablas anteriores se observa diferente comportamiento en cuanto al contenido de antioxidantes, y este depende de las características de cada fruta, se observa que la fresa tiene menor actividad antioxidante, comparada con zarzamora y frambuesa, pero es la fruta que mejor los conserva, al final de los 20 días la fresa aumenta hasta 200% en su contenido de antioxidantes, aunque este aumento puede deberse a la deshidratación, siendo los frutos tratados los que tuvieron más incremento que el testigo, lo cual indica que el tratamiento si favorece la extracción pero también la salida de humedad. No se determinó el contenido inicial de humedad pero si se registró el peso de los frutos en el curso del estudio, posteriormente el cambio en el peso final respecto del peso inicial (%) se determinó y se reporta en las Tablas 5, 6, y 7 para los tres frutos. En esas tablas también se reportan las incidencias de contaminación que se tuvieron y más importante el incremento en la vida útil de los frutos tratados con el CE comparado con el del testigo.

Tabla 5. Monitoreo de vida útil de *Fresas* en días.

Tratamiento	Promedio de vida útil (días)	Pérdida de peso (%)	Contaminación Hongos (%)	Contaminación Microbiana (%)
Testigo	11.4	50	10	20
20 min 0 Hz	15.9	70	10	10
30 min 0 Hz**	17.4	80	10	10
20 min 500 Hz	16.1	60	10	20
30 min 500 Hz	15.4	50	30	10

** Diferencia significativa en pérdida de peso e incremento de vida útil, con prueba de t

El CE mejoró la vida útil de las fresas con la mayoría de los tratamientos hasta después de la segunda semana en la cual se notó una acelerada pérdida de humedad y en algunos casos se inició el crecimiento microbiano. Los tratamientos de 20 y 30 min sin cambios de polaridad (0 Hz), se observa que el crecimiento microbiano se desarrolló de igual manera que el testigo, pero se perdió más agua por lo se sugiere el tratamiento de 20 min con 0 Hz, como una buena alternativa para incrementar la vida útil de las fresas.

Tabla 6. Monitoreo de vida útil de *Frambuesa*

Tratamiento	Promedio de vida útil (días)	Pérdida de peso	Contaminación Hongos	Contaminación microbiano
Testigo	11.3	50	10	50
20 min 0 Hz**	14.6	60	0	40
30 min 0 Hz**	15.4	70	0	30
20 min 500 Hz**	13.0	40	50	10
30 min 500 Hz**	14.1	60	10	30

** Diferencia significativa en pérdida de peso con prueba de t con relación al testigo

Los cuatro tratamientos con CE tienen la capacidad de prolongar la vida útil de las frambuesas, aunque los mejores tratamientos en las frambuesas con CE fueron los de 30 min y 20 min con 500 Hz, presentando un moderado deshidratado, la contaminación con hongos fue menor que la testigo, por lo que se sugiere como mejor tratamiento el de 20 min y 0 Hz.

Tabla 7. Monitoreo de vida útil de *Zarzamora*

Tratamiento	Promedio de vida útil (días)	Pérdida de peso	Contaminación Hongos	Contaminación microbiano
Testigo	24.1	55	0	45
20 min 0 Hz	24.2	63	0	38
30 min 0 Hz**	26.0	75	0	25
20 min 500 Hz	24.1	64	0	36
30 min 500 Hz	24.6	64	0	36

** Diferencia significativa en pérdida de peso e incremento de vida útil, con prueba de t

Como se observa en la tabla anterior los efectos no son tan evidentes como para las otras frutas que se estudiaron en este trabajo sin embargo con el tratamiento de 30 min y 0 Hz se mostró un ligero incremento en la vida útil y una disminución en el crecimiento microbiano es posible que sea debido a una mayor pérdida de humedad.

Las Figuras 4, muestran el comportamiento del color de cada fruto versus testigo.

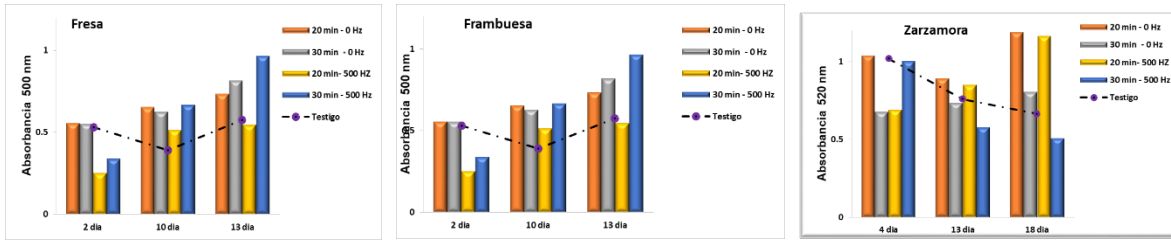


Figura 4. Graficas de absorbancias de cada fruto analizado, para mostrar el comportamiento del color con relación al tiempo

Se observan cambios en el color, que fueron cuantificados en el espectrofotómetro, estos cambios ocurren por las reacciones de oxidación que dan lugar en algunos casos a la pérdida de color o a la formación de compuestos oxidados, los colores en las fresas fueron más variables posiblemente a que los frutos no son totalmente homogéneos, y debido a que los análisis son pruebas destructivas no es posible contar siempre con las mismas características. Las frambuesas tienen un incremento en color muy similar en todas las muestras, y para las zarzamoras los tratamientos de 30 min aparentemente provocaron una disminución en el color, y se dan cambios más evidentes en la tercera semana.

























Las Tablas con fotografías de cada uno de los frutos y su deterioro visual se muestran a continuación

Tabla 8. Comportamiento visual de Fresas, y zarzamoras.

	Antes de tratar	Después de tratar	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Testigo					
20 min 0 Hz					
30 min 0 Hz					
20 min 500 Hz					
30 min 500 Hz					

	Antes de tratar	Después de tratar	Semana 2	Semana 3
Testigo				
20-min-0-Hz				
30-min-0-Hz				
20-min-500-Hz				
30-min-500-Hz				

Tabla 9. Comportamiento visual de Frambuesas.

	Antes de tratar	Después de tratar	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Testigo					
20 min 0 Hz					
30 min 0 Hz					
20 min 500 Hz					
30 min 500 Hz					

CONCLUSIONES

Se probó que bajo ciertos parámetros es posible incrementar la vida útil de las fresas, zarzamoras y frambuesas, sin deteriorar en su capacidad antioxidante logrando disminuir además el crecimiento microbiano.

Se propone para fresas tratamientos de 20 min y 0 Hz, para Zarzamora de 30 min y para frambuesa de 20 min, todos estos sin cambios de polaridad de los electrodos, o frecuencia cero.

Se planea continuar con la experimentación para cuantificar la carga microbiana, y realizar más pruebas con incremento de tiempo.

Uno de los principales problemas encontrados, son la heterogeneidad de las muestras ya que cada lote tratado muestra cambios entre todas las frutas, la selección para cada lote de testigo y Tratamiento es por selección visual, lo cual puede generar errores experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cuevas, R. E. O., "Evaluación del potencial nutraceutico de zarzamoras silvestres y mejoradas," (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. 2011.
2. Ariza, J. A., "Estudio del efecto del campo eléctrico sobre la isomería de los ácidos grasos del aguacate." (tesis de doctorado 2010). Instituto Politécnico Nacional Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, (Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala).
3. Salinas, M., Y., Almaguer, V., G., Peña, V., G., y Ríos, S., R., "Ácido elágico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración". Revista Chapingo Serie Horticultura, 2009. 15 (2), pp. 97-101.
4. Rodríguez García M.V., Guzmán Maldonado S. H., Andrade Esquivel E. & Hernández López, D., "Evaluación de las Propiedades Físicoquímicas y Funcionales de Jugo Obtenido Mediante Tratamiento Enzimático en Zarzamora Comercial (*RUBUS SPP*) del Estado de Michoacán", (XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Guanajuato 2010).
5. Tovar, R. J., "Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la región cafetera" (Tesis de grado 2013). Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.

-
6. Vorobiev, E., Lebovka, N.I., 2006. "*Extraction of Intercellular Components by Pulsed Electric fields*". In: Raso, J., Heinz, V. (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications*. Springer, New York, pp. 153–193.

CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA MUCÍLAGOS DE *OPUNTIA* SPP. Y *SALVIA HISPANICA* L.

Juan Carlos Ramírez-Granados, Blanca E. Gómez-Luna, Rafael A. Veloz-García, Arturo Galván Chávez, Adán T. Morales Vargas, Milagros López-López y Paola F. Magdaleno Medrano

Departamento de Ingeniería Agroindustrial, CCS, Universidad de Guanajuato.
jcramirez@ugto.mx

RESUMEN

En la actualidad es cada vez mayor el interés por fabricar y utilizar productos que sean seguros para las personas y que contribuyan a la conservación del medio ambiente. Esto frecuentemente requiere de la extracción, síntesis y caracterización de materiales que podrían ser utilizados en una amplia variedad de aplicaciones. Una de estas aplicaciones es la fotoprotección de la piel, ya que constantemente requiere de ingredientes activos innovadores que cumplan con las crecientes exigencias de los consumidores. Por esta razón, en este trabajo estudiamos la capacidad que tienen dos materiales naturales para absorber radiación solar que puede ser dañina para la piel de las personas. Los materiales orgánicos que seleccionamos para este estudio son el mucílago de *Opuntia* spp. (nopal) y el de semillas de *Salvia hispanica* L. (chía). El estudio consistió en la determinación de las curvas de calibración de estos mucílagos. Para este propósito, los mucílagos de nopal y de chia fueron extraídos, purificados y secados. Después se prepararon varias soluciones acuosas con diferentes concentraciones de los extractos. Las soluciones fueron analizadas con un espectrofotómetro para determinar su transmitancia y absorbancia espectral como funciones de la concentración del mucílago en las regiones ultravioleta, visible e infrarroja cercana, entre 200 y 1000 nm. Estas curvas de calibración proporcionan un mejor entendimiento de las características de absorción luminosa de los mucílagos de nopal y de chia, y establecen un punto de referencia para comparar estos materiales orgánicos con los ingredientes activos de origen químico que comúnmente son empleados en los protectores solares comerciales. Esto contribuye a evaluar la viabilidad técnica y práctica de usar estos mucílagos como ingredientes activos orgánicos en cremas para la fotoprotección de la piel.

INTRODUCCIÓN

El sol es necesario para la vida; sin embargo, la exposición excesiva de la piel al sol puede provocar efectos adversos. El sol emite todos los tipos de radiación electromagnética que existen. Usualmente, la radiación electromagnética es clasificada en función de su longitud de onda (λ) o de su frecuencia (ν). El espectro electromagnético del sol corresponde al de un cuerpo negro que emite radiación en todas las longitudes de onda, incluyendo a las ondas de radio, microondas, radiación infrarroja, luz visible, radiación ultravioleta (UV), rayos X, rayos gamma y rayos cósmicos. Aunque los rayos X, gamma y cósmicos son muy energéticos y potencialmente peligrosos para la piel, en el área de protección solar son de poco interés ya que estos tipos de radiación luminosa son absorbidos casi en su totalidad por la atmósfera y no llegan hasta la superficie terrestre. En cambio, la radiación UV si puede propagarse a través de la atmósfera terrestre y llegar hasta nuestra piel causándole daños. [1]

La superficie de la Tierra y sus habitantes están expuestos a la radiación UV emitida por el sol, la cual es un tipo de luz invisible para el ojo humano y que consta de longitudes de onda que van desde 200 a los 400 nm. La radiación UV puede subdividirse artificialmente en bandas tales como la UVA, UVB y UVC. Las longitudes de onda entre 400 y 320 nm constituyen a la radiación UVA, las de 320 a 280 nm componen a la radiación UVB y las de 280 a 200 nm a la radiación UVC. Las células de la piel pueden absorber la radiación UVA y UVB, pero la primera penetra más profundamente en las capas de la dermis. De hecho, se ha demostrado que la exposición de la piel a la radiación UVA puede producir una gran variedad de consecuencias dermatológicas, como daños en el ADN y en tejidos, contribuyendo al envejecimiento de la piel. Por otra parte, la radiación UVB también puede penetrar en las células epidérmicas y además es ionizante; así que puede causar daños en el ADN y en las proteínas, y es en gran parte responsable de lesiones que pueden ir desde quemaduras solares ligeras hasta varios tipos de cáncer como los melanomas y carcinomas. [2] Por su parte, los rayos UVC, aunque son más energéticos que los UVA y los UVB, son absorbidos casi completamente por los gases atmosféricos y prácticamente no llegan hasta nuestra piel.

A lo largo de cientos de miles de años y con ayuda de procesos evolutivos, el cuerpo humano logró desarrollar varios mecanismos naturales de protección contra la luz UV como la formación de melanina y la secreción de sudor. Sin embargo, la exposición prolongada al sol puede exceder la capacidad de autoprotección y auto-reparación de la piel, por lo que se debe recurrir a la fotoprotección artificial o externa. Los productos tópicos que actúan como pantallas o bloqueadores solares son la alternativa de fotoprotección complementaria más difundida y aceptada por las personas. [3]

Los protectores solares son formulaciones cosméticas y farmacéuticas capaces de bloquear principalmente a los rayos UVA y UVB mediante fenómenos como la reflexión o la absorción óptica. Por este motivo, usualmente los protectores solares se clasifican como físicos o químicos. A nivel comercial está disponible una gran variedad de protectores solares que generalmente son elaborados en forma de cremas, lociones y aerosoles.

Los protectores solares para la piel deben contener ciertas cantidades de sustancias activas, las cuales son las encargadas de bloquear la radiación UV. [4] Sin embargo, existe polémica por los posibles efectos nocivos que podrían ser causados por el uso prolongado y reiterado de los protectores solares químicos debido a la absorción de compuestos activos que son tóxicos para nuestro organismo. Por esta razón, consideramos que es necesario tener otras alternativas de protección solar que sean más seguras, eficaces y accesibles tales como las basadas en materiales de origen natural.

En investigaciones previamente reportadas se demostró que es factible emplear al mucílago de *Opuntia* spp. y al de *Salvia hispanica* L., figura 1, como ingredientes activos orgánicos para la elaboración de protectores solares debido a sus características de absorción de radiación UV. Además, estos materiales poseen algunas características deseables para su uso en el área de fotoprotección incluyendo su inocuidad, solubilidad en agua, capacidad para retener la humedad y un alto contenido de antioxidantes que ayudan a la regeneración de la piel. Adicionalmente, la extracción de estos mucílagos es sencilla y de bajo costo. [1,3]



Figura 1. Estudiamos las características espectrales de los mucílagos obtenidos a partir de los cladodios de *Opuntia* spp. (A) y de las semillas de *Salvia hispanica* L. (B).

En este trabajo se implementaron dos métodos para la extracción de los mucílagos de nopal y de chí. Luego se determinó la absorbancia y transmitancia de varias soluciones acuosas con concentraciones conocidas de estos mucílagos a diferentes longitudes de onda para obtener una serie de curvas de calibración que permiten determinar con precisión la concentración de una solución o muestra desconocida con mucílago de nopal o de chí. Las curvas de calibración para estos materiales orgánicos fueron determinadas en un rango de longitudes de onda que va desde los 200 a 1000 nm con incrementos de 10 nm, cubriendo las bandas espectrales UVC, UVB, UVA, visible y una parte del infrarrojo cercano. Estas curvas de calibración contribuyen a obtener una mayor comprensión de las características espectrales de absorción y transmisión de los mucílagos de nopal y de chí. A través de las series de curvas de calibración (superficies de calibración) se puede obtener una perspectiva amplia acerca de la capacidad que tienen estos materiales orgánicos

para absorber las bandas de radiación UV, visible e infrarroja cercana para un amplio rango de concentraciones. Esta información podría ser útil para determinar la eficiencia de absorción de radiación UVA y UVB en un protector solar elaborado con estos mucílago como ingredientes activos orgánicos.

TEORÍA

El mucílago de nopal es un polisacárido fibroso altamente ramificado cuyo peso molecular va de 2.3×10^4 a 4.3×10^6 Da, figura 2A. Contiene aproximadamente de 35 a 40% de arabinosa, 20 a 25% de galactosa y xilosa cada una, y de 7 a 8% de ramosa y ácido galacturónico, respectivamente. [5] El mucílago de nopal es un material inocuo muy importante en la industria de los alimentos por sus propiedades físicas y químicas. Este material orgánico tiene la capacidad de formar redes moleculares y de retener fuertemente grandes cantidades de agua; así como de modificar propiedades de los alimentos tales como su viscosidad, elasticidad y textura. El mucílago de nopal también es un buen gelificante, espesante y emulsificante. [6-8]

Por otra parte, el mucílago de chíá es un polisacárido de alto peso molecular, entre 0.8×10^6 y 2×10^6 Da, figura 2B. Este mucílago es extraído de las semillas de *Salvia hispanica* L. cuando entran en contacto con agua. Después de remojar las semillas de chíá por un tiempo, el mucílago comienza a salir de ellas cubriéndolas con un halo transparente. El mucílago de chíá está formado por diferentes azúcares y ácidos urónicos (aproximadamente 25%); además de ser rico en fibra dietética. El mucílago de chíá también es considerado como un hidrocoloide soluble en agua, por lo que posee características interesantes como su capacidad para retener la humedad, lo cual puede ayudar a hidratar la piel. [9-12]



Figura 2. Mucílago secos y pulverizados de *Opuntia* spp. (A) y de semillas de *Salvia hispanica* L. (B).

El estudio a nivel bioquímico de cualquier molécula requiere la utilización de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa; así como su caracterización fisicoquímica y biológica. Uno de los métodos más sencillos y utilizados para este propósito es la espectrofotometría. [13] Por esta razón, después de extraer los mucílago de nopal y de chíá se prepararon varias soluciones con concentraciones conocidas de estos materiales para determinar sus espectros de transmitancia y absorbancia mediante el uso de un espectrofotómetro. [14]

La *transmitancia* (T) de una muestra es la relación que existe entre la intensidad de la luz transmitida que llega al detector después de haber atravesado la muestra, I_t , y la intensidad de la luz que incide inicialmente sobre la muestra, I_0 , y normalmente se representa en porcentaje como:

$$\%T = \frac{I_t}{I_0} 100. \quad \text{Ec. (1)}$$

La transmitancia nos proporciona una medida de la relación de la intensidad transmitida con respecto a la intensidad que incidente sobre una muestra. Sin embargo, la relación entre la transmitancia y la concentración no es lineal, sino que su relación es logarítmica e inversa. Por esta razón, a menudo se prefiere emplear otros parámetros tales como la absorbancia.

La *absorbancia* (A) es un parámetro más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de $1/T$. En consecuencia:

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0}. \quad \text{Ec. (2)}$$

Cuando la intensidad incidente y la transmitida son iguales, la transmitancia es del 100% e indica que la muestra es transparente y no absorbe a esa longitud de onda. La cantidad de luz absorbida depende del ancho de la muestra atravesado por el haz de luz y de la concentración del mucílago. [15-16]

En este punto es esencial recordar que las ecuaciones (1) y (2) consideran el uso de luz monocromática en la medición de la transmitancia y absorbancia, y que su valor es dependiente de la longitud de onda. Por esta razón, es indispensable indicar la longitud de onda empleada para realizar las mediciones. Para determinar los espectros de transmitancia y absorbancia en un rango de longitudes de onda y de concentraciones, es necesario realizar una serie de mediciones de manera manual o automática, dependiendo del tipo de espectrofotómetro con que se cuente.

La absorbancia de una muestra está relacionada con la concentración de moléculas de mucílago mediante la ley de Beer-Lambert. Esta ley establece que la absorbancia de una muestra es directamente proporcional a la concentración de moléculas del analito. En términos matemáticos, la ley de Beer- Lambert se expresa como:

$$A = \epsilon l C, \quad \text{Ec. (3)}$$

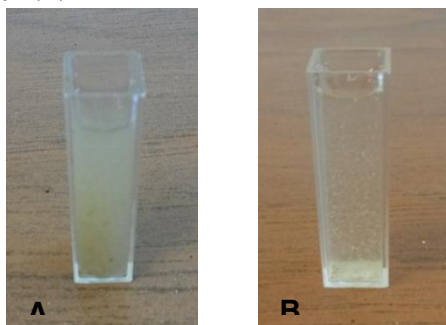
donde ϵ es un coeficiente de absorción molar distintivo de cada tipo de molécula, l es el ancho de la muestra o la distancia atravesada por el haz de luz, y C es la concentración de moléculas del analito. Así pues, con la ecuación (3) es posible determinar la concentración de mucílago en una muestra desconocida o la absorbancia que tendría una crema o loción para protección solar elaborada con una determinada concentración de mucílago de nopal o de chía.

MÉTODO

En trabajos anteriormente reportados se encontró que el mucílago de *Opuntia* spp. y el de *Salvia hispanica* L. son materiales orgánicos que poseen un gran potencial para su uso como ingredientes activos en protectores solares para la piel debido a sus propiedades naturales y a sus características de absorción luminosa. En este trabajo se realizó una amplia caracterización espectral de ambos materiales orgánicos en soluciones acuosas mediante la determinación de una serie de curvas de calibración que relacionan a la transmitancia o absorbancia con la concentración de mucílago en un rango de longitudes de onda que van desde los 200 a los 1000 nm. Con cada serie de curvas de calibración se construyó una superficie de calibración que ayuda a comprender mejor la relación existente entre la transmitancia, la absorbancia y la concentración de mucílago en una muestra; así como su dependencia con la longitud de onda.

Para obtener las curvas de calibración, primero se implementaron métodos reportados previamente para la extracción, purificación y secado de los mucílagos de *Opuntia* spp. y de *Salvia hispanica* L. [1, 5] Luego se elaboraron varias soluciones patrón con agua destilada y mucílago de nopal o chía como las mostradas en la figura 3.

Figura 3. Ejemplos de soluciones acuosas con mucílago de *Salvia hispanica* L. (A) o de *Opuntia* spp. (B).



En el caso del mucílago de nopal, se prepararon 14 soluciones acuosas cuya concentración varió de 0.4 a 5.6 mg/ml; mientras que para la caracterización de mucílago de chíá se elaboraron 13 soluciones cuya concentración varió de 0.8 a 12 mg/ml. Para determinar la transmitancia y la absorbancia de las soluciones patrón se utilizó un espectrofotómetro de la marca Jenway®, modelo 3705 cuya imagen y esquema simplificado se presentan en la figura 4.

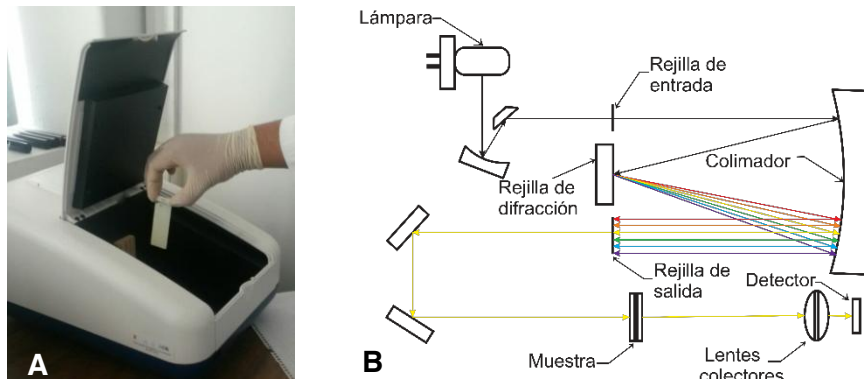


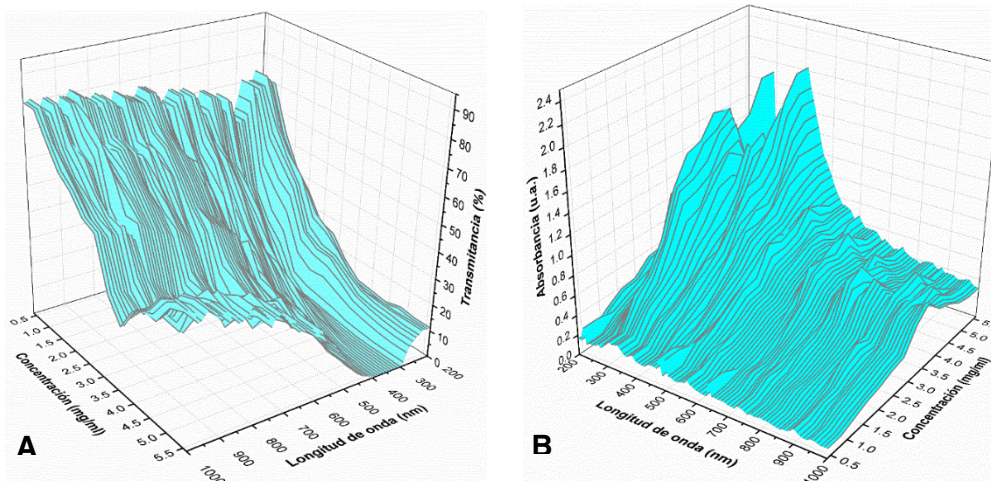
Figura 4. Imagen (A) y configuración experimental simplificada (B) del espectrofotómetro Jenway® 3705 empleado para la caracterización de las soluciones patrón con mucílago de *Opuntia* spp. o de *Salvia hispanica* L.

Este espectrofotómetro tiene un diseño de haz sencillo y es sensible en el rango de 200 a 1000 nm. Está constituido fundamentalmente por una lámpara de amplio espectro, rejillas de entrada y salida, una rejilla de difracción para separar la luz en sus diferentes longitudes de onda, un espejo colimador, un soporte para la muestra, lentes colectores y un fotiodo como detector. Cabe mencionar que las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente ($T_{amb}=27\text{ }^{\circ}\text{C}$) y que el ancho de las muestras analizadas con el espectrofotómetro fue de 1.00 cm.

RESULTADOS

En este trabajo medimos la transmitancia y la absorbancia de 27 soluciones patrón con diferentes concentraciones de mucílago de nopal o de chíá. Estas mediciones fueron realizadas en el rango espectral que va desde los 200 a los 1000 nm. En la figura 5, se muestran las series de curvas de calibración para la transmitancia (figura 5A) y la absorbancia (figura 5B) de las soluciones acuosas con mucílago de nopal.

Figura 5. Curvas de calibración para la transmitancia (A) y absorbancia (B) de soluciones acuosas con mucílago de *Opuntia* spp. (nopal) para longitudes de onda entre 200 y 1000 nm.

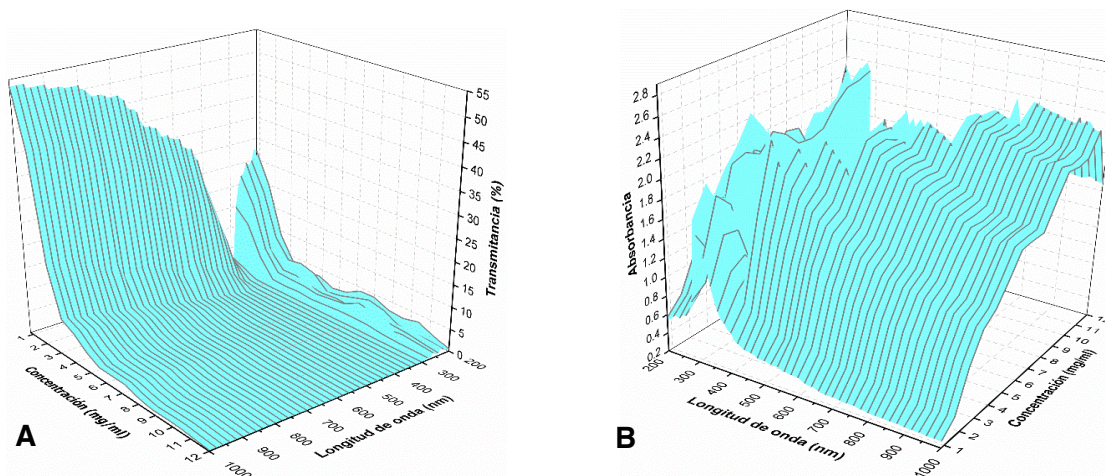


En la parte A de la figura 5 se muestran las curvas del porcentaje de transmitancia contra la concentración de mucílago de nopal a diferentes longitudes de onda. En estas curvas se observa que a concentraciones bajas (menores que 1 mg/ml), la transmitancia tiene un valor alto que se encuentra entre el 60 y el 80% para las longitudes de onda entre 200 y 1000 nm. A medida que la concentración de moléculas de mucílago de nopal aumenta en las soluciones patrón, su transmitancia disminuye. Incluso, el porcentaje de transmitancia llega a ser cercano a cero para concentraciones mayores que 3.5 mg/ml y longitudes de onda que se encuentran entre 300 y 400 nm. Estas soluciones con concentraciones de mucílago de nopal mayores a 3.5 mg/ml son ideales para la fabricación de protectores solares para la piel ya que absorben casi en su totalidad a la radiación UVA y UVB, evitando daños en la piel.

En la parte B de la misma figura se presentan las curvas de calibración para la absorbancia del mucílago de nopal. En esta figura se puede apreciar que la absorbancia aumenta a medida que se incrementa la concentración del mucílago. La absorbancia también se incrementa a medida que la longitud de onda disminuye desde los 1000 nm hasta los 300 nm, donde el mucílago de nopal presenta su mayor absorbancia y al mismo tiempo su transmitancia es cercana al 0%. Esta serie de curvas de calibración confirman que el mucílago de nopal presenta su mayor absorbancia en las regiones UVA y UVB, y que esas bandas espectrales son casi totalmente absorbidas cuando las soluciones con mucílago de nopal tienen una concentración superior a los 3.5 mg/ml.

En la figura 6 se presentan las curvas de calibración para la transmitancia y la absorbancia de las soluciones patrón con mucílago de chía.

Figura 6. Transmitancia (A) y absorbancia (B) de soluciones acuosas con diferentes concentraciones de mucílago de *Salvia hispanica* L. (chía) medidas entre 200 y 1000 nm.



En la parte A de la figura 6 se muestran las curvas de calibración para la transmitancia del mucílago de *Salvia hispanica* L. En esta gráfica es posible apreciar que el porcentaje de transmitancia de las soluciones disminuye a medida que aumenta la concentración del mucílago de chía en todas las longitudes de onda estudiadas. También es posible apreciar que, para una concentración fija, el porcentaje de transmitancia disminuye conforme la longitud de onda decrece desde 1000 hasta 300 nm, donde el porcentaje de transmitancia alcanza valores cercanos al 0%, incluso en soluciones con concentraciones bajas (cercasas a 2 mg/ml). Para longitudes de onda entre 200 y 300 nm, que corresponden primordialmente a la banda UVC, se aprecian pequeños picos en la transmitancia; sin embargo, son considerados de poca importancia porque su magnitud es pequeña ya que está por debajo del 10%, además de que este tipo de radiación luminosa es absorbida casi en su totalidad por los gases atmosféricos antes de llegar a nuestra piel.

En la parte B de la misma figura se muestra la serie de curvas de calibración para la absorbancia de las soluciones con mucílago de chía. En estas curvas de calibración se observa que la absorbancia es máxima a longitudes de onda cercanas a los 300 nm, llegando a alcanzar valores mayores que 2.8 unidades. También se observa que la absorbancia de las soluciones aumenta rápidamente con la concentración de mucílago de chía en todas las longitudes de onda debido a una mayor presencia de moléculas absorbentes y a su eficiencia para capturar radiación UV, visible e infrarroja cercana. Las curvas de calibración de la figura 6 indican que las soluciones con mucílago de chía permiten la transmisión de menos del 10% de la radiación incidente, incluso a concentraciones bajas (2 ó 3 mg/ml), y que la transmitancia disminuye casi hasta 0% para concentraciones de mucílago cercanas al punto de saturación (12 mg/ml) a temperatura ambiente. Lo anterior se cumple para todas las longitudes de onda entre 200 y 1000 nm. En el caso de las soluciones con mucílago de chía, el porcentaje de transmitancia alcanza valores mínimos (absorbancia máxima) entre 300 y 400 nm, lo cual corresponde justamente a la radiación UVA y UVB que se pretende bloquear mediante el uso de protectores solares para la piel.

Las curvas de calibración mostradas en las figuras 5 y 6 confirman que los mucílago de nopal y de chía tienen su máxima absorbancia en la banda espectral que va desde los 300 a los 400 nm, que corresponde primordialmente a las bandas UVA y UVB. En el área de fotoprotección de la piel se busca justamente la absorción o reflexión de la radiación luminosa con estas longitudes de onda ya que son potencialmente dañinas para la piel. Por esta razón, estos resultados ratifican que tanto el mucílago de nopal, como el mucílago de semillas de chía pueden ser usados como ingredientes activos para la absorción de radiación UVA y UVB en protectores solares tópicos.

Una de las diferencias más significativas entre estos mucílago es que el mucílago de chía presenta una baja transmitancia (alta absorbancia) prácticamente en todo el rango espectral estudiado, a diferencia del mucílago de nopal, incluso en concentraciones tan bajas como 2 mg/ml. Esto nos

indica que el mucílago de chía tiene una mayor capacidad para absorber radiación UV, visible e infrarroja cercana en comparación con el mucílago de nopal. En contraste, la alta absorbancia del mucílago de nopal se presenta de manera más específica para radiación UVA y UVB, y para concentraciones mayores a 3.5 mg/ml.

Otra diferencia entre las soluciones con mucílago de nopal y de chía es que se requieren diferentes cantidades de mucílago para obtener transmitancias y absorbancias similares. Comparando las gráficas de las figuras 5 y 6 se puede notar que una solución con mucílago de nopal llega al punto de saturación a temperatura ambiente cuando su concentración es cercana a los 5.5 mg/ml; mientras que una solución con mucílago de chía requiere de aproximadamente 12 mg/ml para llegar al mismo punto. Más aun, para obtener una transmitancia cercana al 1.0% a 300 nm, en una solución con mucílago de nopal se requiere una concentración cercana a 3.5 mg/ml; mientras que si la solución contiene mucílago de chía se requiere una concentración de 2.0 mg/ml. Es decir, se requiere aproximadamente un 43% menos mucílago de chía, que mucílago de nopal, para obtener un mismo nivel de transmitancia y de protección contra la luz solar. Sin embargo, el nopal es menos costoso que las semillas de chía; además de que el nopal tiene mayor disponibilidad. Así pues, el mucílago de chía presenta mayor capacidad para absorber la radiación solar; sin embargo, también es más costoso y menos accesible que el mucílago de nopal.

CONCLUSIONES

En este trabajo determinamos la transmitancia y la absorbancia como función de la longitud de onda y de la concentración de 27 soluciones acuosas con mucílago de *Opuntia* spp. (nopal) y de *Salvia hispanica* L. (chía). Con las transmitancias y absorbancias medidas en las soluciones se generaron series de curvas de calibración que en conjunto forman superficies de calibración para la transmitancia y la absorbancia de los mucílagos de nopal y de chía. Estas series de curvas de calibración permiten determinar la concentración de una muestra desconocida con mucílago de nopal o de chía con tan sólo medir su transmitancia o absorbancia a alguna longitud de onda entre 200 y 1000 nm. Adicionalmente, estas curvas de calibración permiten entender mejor la variación de la transmitancia y la absorbancia de las soluciones con mucílago de nopal o de chía con respecto a su concentración y la longitud de onda. Mediante las superficies de calibración también corroboramos que tanto el mucílago de nopal, como el de chía poseen una baja transmitancia (alta absorbancia) de radiación UVA y UVB; por lo tanto, ambos pueden ser usados como ingredientes activos orgánicos para la absorción de luz ultravioleta en protectores solares para la piel. Más aun, se encontró que el mucílago de semillas de chía tiene un amplio espectro de absorbancia que incluye a las bandas UVB, UVA, visible e infrarroja cercana, alcanzando valores pico mayores a 2.8 unidades y transmitancias cercanas al 0% en soluciones con concentraciones superiores a 2 mg/ml. Por otra parte, se encontró que el mucílago de nopal absorbe eficientemente sólo una banda estrecha que incluye a la radiación UVA/UVB cuando las soluciones tienen una concentración mayor a 3.5 mg/ml. Lo anterior indica que el mucílago de chía tiene un espectro de absorbancia más amplio que el mucílago de nopal; además de que las soluciones con mucílago de chía requieren aproximadamente un 43% menos mucílago en comparación con las soluciones con mucílago de nopal. Sin embargo, el nopal es más económico y accesible que las semillas de chía. Por lo tanto, el mucílago de nopal podría ser empleado como ingrediente activo orgánico en protectores solares regulares; mientras que el mucílago de chía podría ser usado en la elaboración de protectores solares de amplio espectro.

BIBLIOGRAFÍA

1. J. C. Ramírez-Granados, B. E. Gómez- Luna, *et al.*, "Análisis de la absorbancia y transmitancia espectral del mucílago de *Salvia hispanica* L. para la fotoprotección de la piel", Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la División de Ciencias de la Salud e Ingenierías de la Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, 2017.
2. R. Hellwig, M. Gripenrog, S. Templeton, "Shining the Light on Sunscreen", *US Pharm.* 2012, Vol.4, pp. 36-39.
3. J. C. Ramírez-Granados, B. E. Gómez- Luna, *et al.*, "Caracterización espectral de una crema corporal con extracto de *Salvia hispanica*", Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la

- División de Ciencias de la Salud e Ingenierías de la Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, 2017.
4. P. Singh, A. Nanda, "Enhanced sun protection of nano-sized metal oxide particles over conventional metal oxide particles: An in vitro comparative study", *International Journal of Cosmetic Science*, pp 273–283, 2014.
 5. S. Rodríguez Gonzáles, H. E. Martínez Flores, J. L. Ornelas Núñez, *et al.*, "Optimización de la extracción del mucílago de nopal (*Opuntia-Indica*)", Facultad de Química y Farmacobiología, Laboratorio de Investigación de Alimentos, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.
 6. Gibson, C. A., Nobel, S. P. "The cactus primer". First Harvard University Press paperback edition. p. 196-199, 1990.
 7. Sepulveda, E., Saenz, C. Aliaga, E. and Aceituno, C. "Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia spp*". Departamento. de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago Chile, 2006.
 8. Ruiz, H. F., Guerrero, B. J. A. "Aplicación de las películas comestibles a base de quimostato y mucílago de nopal en fresa (*Fragaria ananasa*) en refrigeración". Tesis de maestría. Ciencia en alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Puebla. pp 21-23, 2009.
 9. C. Gallardo Cabrera, J. D. Pazmiño Arteaga, I. S. Enríquez Benavides, "Extracción y caracterización reológica del mucílago de *Malvaviscus penduliflorus* (San Joaquín)", *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Vol. 18(4), pp. 567-574, 2013,
 10. C. Sáenz, "Utilización agroindustrial del nopal", *Boletín de servicios agrícolas de la FAO*, 2006, p. 106
 11. J. A. Hernández Gómez, S. Miranda Colin, "Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispanica*)", *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol. 31(2), pp. 105-113, 2008.
 12. C. A. Silva Sánchez, "Evaluación técnica comercial del aprovechamiento de la semilla de Chía (*Salvia hispanica*) para la elaboración de productos alternos", Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias, 2015.
 13. N. A. Díaz, J. A. Bárcena Ruíz, E. Fernández Reyes, *et al.*, "Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas", Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
 14. Skoog, D. A.; Holler F. J. & Crouch S. R. *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning Latin America, 6^{ta} ed., 2008.
 15. Federal Register. Rules and Regulations, Vol. 76, 117, 2011.
 16. Ch. Brown. "Ultraviolet, visible, and near-infrared spectrophotometers", *Applied Spectroscopy Reviews*, Vol. 35(3), pp. 151-173, 2000.

ESTIMACIÓN DE LA TOXICIDAD MICROBIANA PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS RICOS EN CROMO (VI)

Ivonne García Baca, Arodí Bernal Martínez, Germán Cuevas Rodríguez

Departamento de Ingenierías Civil. División de Ingenierías. Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato.

RESUMEN

Actualmente el Cromo es un metal necesario en la fabricación de productos de uso cotidiano, derivando en contaminación ambiental por Cromo (VI) que resulta un peligro para la salud humana por sus efectos toxicológicos. Existen pocos estudios de biorreducción del Cromo (VI) en condiciones anaeróbicas, por lo que no se han identificado muchos de los factores involucrados en este proceso. Esta investigación evaluó la capacidad de biotransformación del Cromo(VI), mediante la determinación de la Dosis Mínima Inhibitoria (DMI), el tiempo, la cinética de crecimiento y reducción del Cromo(VI) de un consorcio microbiano proveniente de un reactor anaerobio dosificado con lixiviados con alto contenido de Cromo(VI), expuesto a diferentes concentraciones de Cromo(VI) y utilizando efluentes residuales alternativos como fuente de carbono. La DMI del consorcio microbiano determinada fue de 100 mg/L de Cromo(VI), con un tiempo de desarrollo de colonias de 2 días y, la reducción de Cromo(VI) se presentó en 4 días con la máxima concentración de 200 mg/L. Con ello, se concluye que el consorcio microbiano demostró ser resistente y capaz de reducir el Cromo (VI), por lo que la reducción biológica de lixiviados ricos en Cromo(VI) por vía anaerobia se considera buena opción de biorremediación de sitios contaminados con este metal.

INTRODUCCIÓN

La economía de León, Gto., está basada fuertemente en la cadena de producción cuero- calzado. Por lo anterior, en el valle de León se ha encontrado Cromo (VI) en tres cuartas partes de los pozos que se abastecen a la ciudad [1]. La zona más contaminada con Cromo en el Valle de León se encuentra a 13.5 Km al suroeste de la Ciudad de León y a 7 Km de San Francisco del Rincón [2]. Una de las principales fuentes potenciales son las instalaciones de la fábrica de cromatos de Química Central (QC) que fue clausurada en 2014, y que cuenta con un sitio de disposición final de residuos industriales ubicado a 1.5 Km al oeste [3], el cual contiene alrededor de 300,000 toneladas de residuos a la intemperie que aún siguen latentes en el interior de la industria, produciendo un alto contenido de lixiviados [2;4].

El Cromo es un metal que presenta varios estados de oxidación (los derivados de importancia biológica son 3+ y 6+) y tiende a formar iones complejos [5]. La presencia del Cr(III) en el ambiente existe de forma natural en rocas, animales, plantas, suelo y agua, que al contacto con material orgánico puede cambiar de Cr(VI) a Cr(III) [6]. Cabe mencionar que el Cr(III) es un elemento traza esencial para los seres vivos debido a que ayuda a mantener los niveles correctos del metabolismo de la glucosa, de los lípidos y proteínas en seres vivos. En cambio, el Cr(VI) puede alterar el equilibrio causando efectos tóxicos tanto en plantas como en animales, debido a que este es absorbido rápidamente por las membranas biológicas, siendo el tracto respiratorio el blanco principal [7].

Por ello, la biorremediación busca resolver los problemas generados por la contaminación mediante el uso de seres vivos que persisten en ambientes desfavorables y son potencialmente capaces de remover, extraer, degradar y transformar compuestos orgánicos e inorgánicos contaminantes en suelo, sedimento o agua [8;9]. Los mecanismos bioquímicos asociados a la reducción de Cr(VI) involucran: biosorción, transporte, bioacumulación, biomineralización, oxidación-reducción de metales y reducción enzimática (enzimas membranales o de la fracción soluble como las reductasas) [10], y algunos de los factores que influyen en la reducción biológica del Cr(VI) incluyen la concentración inicial de la biomasa, el tipo y abundancia de la misma, los iones potenciales como MnO^- , Fe^{2+} , SO_4^{2-} (contenidos en los efluentes residuales como el ARD y el ARL), la fuente de energía y la afinidad del microorganismo a la fuente de carbono, el pH, la temperatura, el potencial REDOX y los ácidos orgánicos presentes en la materia orgánica [9;11].

Algunas bacterias Gram + presentan la capacidad para reducir el ion cromato en condiciones aeróbicas, sin embargo no son los únicos microorganismos capaces de reducir el Cr (VI) a Cr(III). La capacidad de reducir Cr anaeróbicamente no es un proceso estrictamente específico, y puede

ser llevada a cabo tanto por bacterias Gram +, como Gram -. Existen pocos estudios de reducción de Cr (VI) bajo condiciones anaeróbicas, uno de los cuales reporta la reducción del Cr (VI) en concentraciones de hasta 250 mg/L con buenos resultados bajo estas condiciones [12], más, sin embargo, no se ha identificado la dosis mínima de inhibición (DMI) del Cr(VI) en el consorcio de los microorganismos involucrados en la reducción, el tipo y la morfología de estos, ni el tiempo específico en el que proceso de reducción se lleva a cabo.

Debido a lo antes mencionado, el objetivo del presente trabajo es evaluar la toxicidad del Cromo (VI) sobre el crecimiento de un consorcio microbiano adaptado, determinando su tolerancia y analizando la actividad deshidrogenasa del consorcio microbiano.

PARTE EXPERIMENTAL

El consorcio microbiano utilizado en el presente trabajo proviene de un reactor anaerobio que lleva en operación 365 días (el cual reduce 250 mg/L Cr(VI), alimentado con fuentes de carbono alternativas) inoculado con microorganismos provenientes del lago de Parangueo, ubicado en el municipio de Valle de Santiago, Guanajuato, en la zona conocida como "Las Siete Luminarias", el cual se considera un sitio extremo, debido a la presencia de altas concentraciones salinas. Como fuente de carbono alternativa (FCA) para el consorcio, se utilizó la combinación de agua residual doméstica (ARD) y agua residual láctica (ARL), en una proporción 50:50 %V/V.

Determinación de la Dosis Mínima Inhibitoria y adaptación de los microorganismos reductores de Cr (VI)

Para determinar la DMI del Cr (VI) sobre el consorcio microbiano, se realizaron cultivos en placa expuestos a diferentes concentraciones (50, 75, 100, 150, 200 y 250 mg/L de Cr (VI)), utilizando agar bacteriológico al 30% p/v sobre la fuente de carbono previamente pasteurizada y la adición de 1 mL de inóculo, en un tiempo de incubación de 7 días a temperatura ambiente. Para asegurar condiciones anaerobias en la placa, esta fue sellada con papel parafilm. Transcurrido este lapso se procedió con la identificación de aquellas placas en las que se presentó crecimiento microbiano y reducción del Cr(VI); además se llevó a cabo una tinción Gram correspondiente a cada una de ellas, esto con el fin de identificar los tipos de bacterias presentes y resistentes a la presencia del Cr (VI). Posteriormente se procedió a la adaptación del consorcio a una determinada concentración de Cr (VI) mediante la elaboración de 5 resiembras por estriado en placa de Petri con 50 mg/L de Cr (VI) a un tiempo de exposición de 7 días.

Evaluación del desarrollo de microorganismos expuesto a Cr (VI)

Se realizó la determinación del tiempo de desarrollo de colonias, mediante la siembra en placa con 50 mg/L de Cr(VI) en 7 periodos de tiempo (por duplicado) de los microorganismos adaptados con anterioridad a esta misma concentración, en la cual cada periodo de tiempo corresponde a 1 día de exposición. Al presentarse el primer indicio de crecimiento microbiano, se elaboró tinción Gram para la observación morfológica de los microorganismos presentes en cada periodo de tiempo.

Determinación de la cinética de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento del consorcio se elaboraron cultivos en medio líquido (ARL+ARD en proporción 50:50 %v/v) con concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 mg/L de Cr(VI), además de sus respectivos controles sin inocular, además de un blanco, el cual solo contenía el medio líquido. El diseño del experimento se muestra en el Tabla 1. Cada cultivo, según su concentración, fue evaluada a diferentes periodos de exposición y en cada uno de ellos se determinaron los siguientes parámetros: pH, potencial redox (Predox), densidad óptica, actividad deshidrogenasa (ADH), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y determinación de la disminución de Cr(VI).

Tabla 1. Diseño del experimento para la evaluación de parámetros cinéticos.



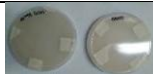

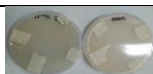

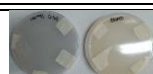

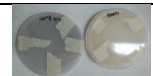
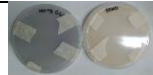
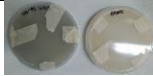
mg/L Cr(VI)	Tiempo de exposición						
0	T ₀						
50	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄		
100	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	
150	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
200	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆

RESULTADOS

Determinación de la Dosis Mínima Inhibitoria adaptación de los microorganismos reductores de Cr(VI)

De las concentraciones evaluadas se pudo obtener que, los microorganismos presentes en el consorcio pueden crecer en presencia de hasta 100 mg/L de Cr(VI), inhibiendo su crecimiento a partir de 150 mg/L de Cr(VI), como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Formación de colonias con exposición al Cromo (VI) en placa de Petri.

mg/L Cr(VI)	Aspecto de la placa	Tinciones Gram
Control		
50		
75		
100		
150		Sin crecimiento microbiano
200		Sin crecimiento microbiano
250		Sin crecimiento microbiano

Gracias a la elaboración de la tinción de Gram, se pudo observar que, en el consorcio se encuentra una mayor población de bacterias en forma de bacilos Gram + y, menormente Gram -, con lo que

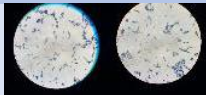

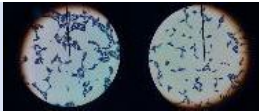
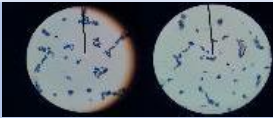
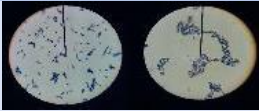
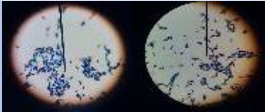
se comprueba que las bacterias Gram + presentan una mayor resistencia y reducción del ion cromato en condiciones anaeróbicas.

Al realizar la adaptación del consorcio se logró aumentar la resistencia de éste a la presencia del Cr(VI) y, además, con ello, se denotó una reducción considerable en el tiempo de crecimiento que se había presentado anteriormente (6 y 7 días aproximadamente).

Evaluación del desarrollo de microorganismos expuesto a Cr(VI)

El tiempo en el que se presentaron los primeros indicios de crecimiento, fue a partir del segundo día, estos resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Determinación del tiempo de proliferación de microorganismos expuestos a Cr (VI).

Tiempo (días)	Observaciones	Tinción Gram
1	Disminución de la coloración amarillo. Sin crecimiento microbiano.	ND
2	Disminución de la coloración amarillo en agar y presencia de crecimiento de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría se presentan bacterias Gram +.	
3	Disminución de la coloración amarillo característico del Cr ⁶⁺ . Presencia de bacilos de diversos tamaños, mayormente Gram +.	
4	Presencia de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría Gram +. Disminución de coloración amarillo en medio de cultivo.	
5	Presencia de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría Gram +. Cambio de coloración de amarillo a gris-azulado en el medio de cultivo.	
6	Presencia de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría Gram +. Coloración del agar con tendencia al gris-azulado	
7	Presencia de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría Gram +. Coloración de agar con tendencia al gris-azulado.	

ND: No determinado

Determinación de la cinética de crecimiento

En la Tabla 4 se presentan los resultados de las pruebas para la determinación de los parámetros cinéticos, pero solo para los controles (sin microorganismos) y blancos [sin exposición a Cr(VI)]. En la que se observa que la presencia de microorganismos si influyó en la mayoría de los parámetros evaluados. En los controles se puede apreciar que, tanto el pH como el Predox aumentaron al presentar mayor concentración de Cr(VI), en cambio, los SSV disminuyeron a mayor concentración de Cr(VI). En cuanto a la determinación de Cr(VI) presente, se puede apreciar que este, al contacto

con la materia orgánica presente en el medio de cultivo, reduce la concentración de Cr(VI).

Tabla 4. Comportamiento de los controles y blancos en las pruebas para la determinación de parámetros cinéticos.

Parámetro	pH	Predox x (mV)	D.O. (Abs)	ADH (mg/L)	Cr(VI) (mg/L)	SSV (mg/L)
ARL+ARD	3.56	157	0	0.51	1	640
ARL+ARD+ μorg	3.59	152	0.223	4.72	1	1260
50 mg/L Cr(VI) Sin μorg	3.63	283.5	0.162	- 0.38	5	1085
100 mg/L Cr(VI) Sin μorg	3.655	347.5	0.136 5	-0.15	16	855
150 mg/L Cr(VI) Sin μorg	3.7	362	0.219 5	1.65	30	760
200 mg/L Cr(VI) Sin μorg	3.71	371. 5	0.200 5	1.8	39.5	475

Los resultados obtenidos para las pruebas con exposición a las diferentes concentraciones y periodos de tiempo se muestran a continuación en la Tabla 5, donde se puede apreciar que, tanto en el Predox y la ADH de cada concentración tendió a disminuir a lo largo del tiempo de exposición, pero los datos de esta última no se consideran relevantes debido a que el método de análisis no fue el adecuado para la determinación de la actividad microbiana, ya que presentó cantidades muy pequeñas, llegando a ser indetectables por este método. En cuanto al pH se observa que hay una mayor tendencia a aumentar, con presto se va dando la reducción del Cromo.

Tabla 5. pH, Predox y ADH en pruebas de reducción de Cr(VI).

Pará- metro	50 mg/L		100 mg /L		150 mg/L		200 mg/L	
	Inicial	Final	Inicia l	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
pH	3.675	3.60 5	3.67 5	3.74 5	3.71	3.81	3.705	3.92
POR	316.5	105. 5	357. 5	56.5	371	58.5	382	78.5
ADH	-0.33	-0.58	1.21 5	0.09 5	1.025	-0.33	2.035	0.74

Al determinar la presencia de Cr (VI) (Figura 1) a lo largo del tiempo, se puede apreciar que en todos los casos después del día 2, la reducción de la concentración de Cr(VI) es evidente, llegando a disminuir notablemente al término del experimento.

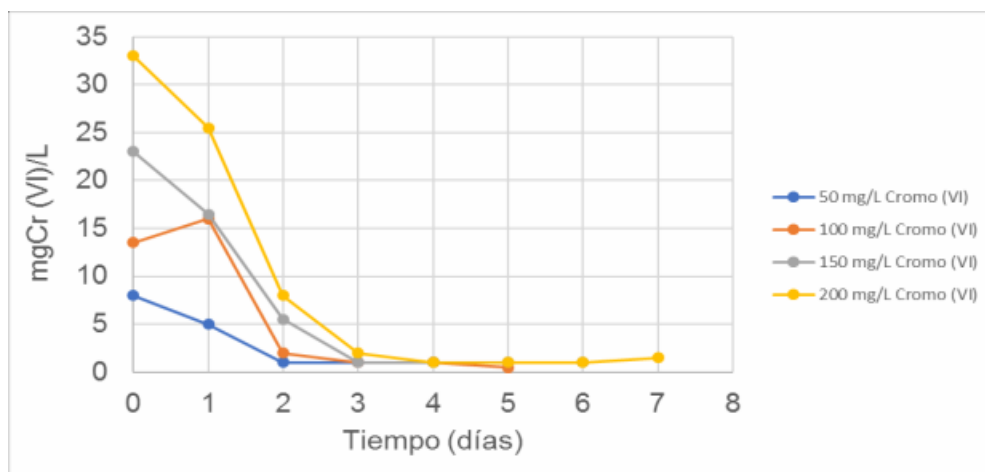


Figura 1. Determinación de Cr (VI) durante el periodo de exposición.

En cuanto a la determinación de SSV, como se muestra en la figura 2, se puede apreciar que, el contenido de estos fue aumentando a partir del día 1 en todos los casos. Luego se mantuvo relativamente constante hasta el día 4, para posteriormente para las concentraciones de 50 y 100 mg/L disminuir. En cambio, para las concentraciones de 150 y 200 mg/L, nuevamente se ve incrementados los valores (posiblemente debido a otra fase de crecimiento).

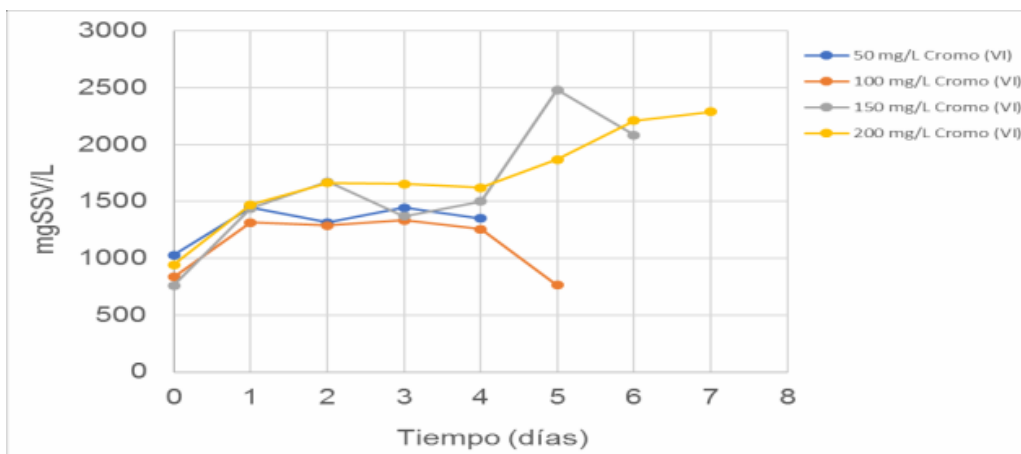


Figura 2. Sólidos suspendidos volátiles durante el periodo de exposición.

En la figura 3 se presentan los datos obtenidos para la densidad óptica en la que se puede apreciar que, en todos los casos se obtuvo un mayor crecimiento microbiano en los dos primeros días de exposición, después un periodo de disminución considerable hasta el día 4, y posteriormente, un

nuevo aumento en la densidad poblacional. Por lo que se comprueba que la reducción de Cr (VI) a Cr(III) se llevo a cabo hasta el día 2, después un periodo de muerte y adaptación al Cr (III) y finalmente un nuevo episodio de crecimiento microbiano, al igual que con los SSV que presentó un comportamiento similar

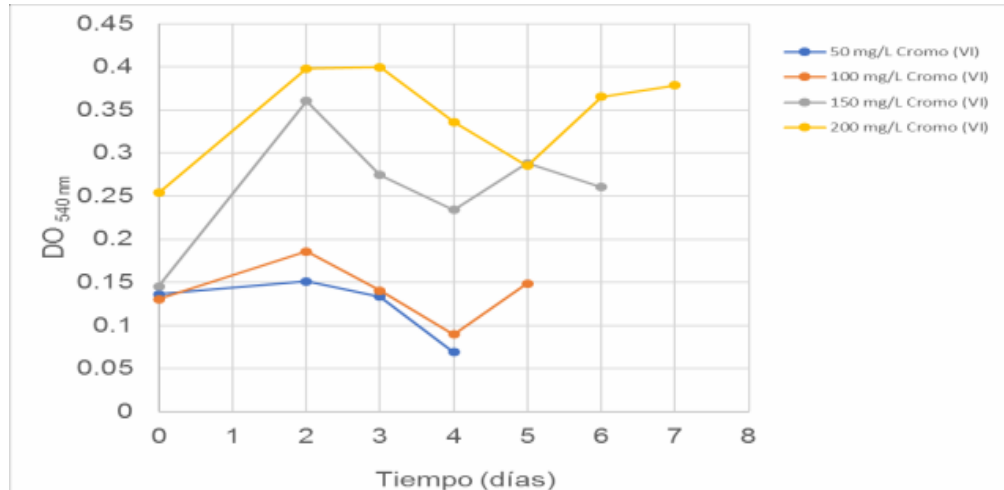


Figura 3. Densidad óptica durante el periodo de exposición.

A partir de los datos anteriores, se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) del consorcio en cada caso (mediante el uso de las ecuaciones de Monod), los cuales se muestran en la Tabla 6 y donde se puede apreciar que al incrementar las concentraciones de Cr(VI), la velocidad específica de crecimiento disminuye y el tiempo de duplicación aumenta.

Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación.

Parámetro	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
μ (día ⁻¹)	0.335	0.187	0.116	0.101
t_d (día)	2.065	3.700	5.959	6.844

CONCLUSIONES

El consorcio microbiano demostró ser resistente y capaz de reducir el Cr(VI). El tiempo de crecimiento microbiano para 50 mg/L Cr(VI) fue de 2 días, gracias a que el consorcio se hizo más resistente con la elaboración de las resiembras, y al aumentar la concentración de Cr(VI) hasta 200 mg/L, el tiempo de reducción aumenta, pero se da en un lapso máximo de 4 días. En cuanto a la cinética de crecimiento, se llegó a la conclusión de que al incrementar las concentraciones de Cr(VI), la velocidad específica de crecimiento disminuye y el tiempo de duplicación aumenta. Por otro lado, la DMI se determinó fue de 100 mg/L de Cr(VI), y la morfología de los microorganismos presentes en el consorcio fue mayormente bacilos Gram +, viéndose también en menor y casi nula proporción, bacilos Gram -. Dicho lo anterior, la reducción biológica de Cr(VI) por vía anaerobia se considera una buena opción de biorremediación de sitios contaminados con este metal, aunque aún falta por estudiar más a fondo como es que el proceso se lleva a cabo y optimizar el proceso.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento del proyecto de investigación BIOMETAL 188775 y a la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado por la beca otorgada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blackman, A. (2005). Adoption of Clean Leather-Tanning in Mexico. Discussion Paper. Resources for the future. Washington, DC.
2. Armienta, M.A. y Rodríguez, R., Cisneros, N., Juárez, F., Cruz, O. (1996). Distribution, origin and fate of chromium in soils in Guanajuato, México. *Environmental Pollution*. 91:391-397.
3. Reyes G., L.R., Romero G., E.T., Olmos S, M. G. y Rodríguez C,
4. R. (2009). Chemical species of chromarite o fan industrial landfill in the Leon Valley, Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 26:104-116.
5. Armienta, M.A., Quere, A., (1995). Hydrogeochemical behavior of chromium in the unsaturated zone and in the acuifer of León Valley, Mexico. *Enviromental Pollution*. 91:391-397.
6. Palmer, C. D. y Wittbrodt P. R. (1991). Processes affecting the remediation of chromium contaminated sites. *Enviromental Health Perspectives*. 92:25-40.
7. EPA, (2010). Cromo (VI) en agua potable; (EPA 815-F-10-006)
8. U.S. Environmental Protection Agency. Washington D.C. Diciembre.
9. Villalobos A., Ellis A., Armienta M.A., Morton. B.O, and Johnson
10. T.M. (2012). Geochemistry an Cr stable isotopes of Cr-contaminated groundwater in Leon valley, Guanajuato, Mexico. *SVSD; Applied Geochemistry* 27:1783-1794.
11. Vullo, D.L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. 2(3).
12. Adeniji, A. (2004). Bioremediation of Arsenic, Chromium, Lead and Mercury. Recuperado de http://www.cluin.org/download/studentpapers/bio_of_metals_paper.pdf.
13. Tekerlekopoulou, A.; Tsiamis, G.; Dermou, E.; Siozios, S.; Bourtzis, K. and Vayenas, D.V. (2010). The effect of carbon source on microbial Community structure and Cr (VI) reduction rate. *Biotechnology and Bioengineering*. 107(1):478-478.
14. Michailides. M, Tekerlekopoulou A.G., Akratos C.S., and Vayenas D.V. (2012). A kinetic study of biological Cr (VI) reduction in drawfill reactors. *Memoria de congreso Protection and restoration of the enviroment XI. Wastewater treatment and management, Thessaloniki, Greece*. Julio 2012.
15. Moreno González, A. (2017). Propuesta de un sistema anaerobio como alternativa para el tratamiento de lixiviados ricos en Cromo hexavalente de una industria química. Tesis de Maestría en Ciencias del Agua. Universidad de Guanajuato. División de Ingenierías, Campus Guanajuato. Departamento de Ingeniería Geomática e Hidráulica.

DESARROLLO VEGETATIVO DE HOJAS, TALLOS Y RAÍCES DE PIÑA MD-2 BAJO NUTRICIÓN ORGÁNICA CON CUBIERTA PLÁSTICA

Andrés Rebolledo Martínez¹, Laureano Rebolledo Martínez¹, Daniel E. Uriza Ávila¹, Rosa Laura Rebolledo García¹, María Enriqueta López Vázquez¹, Rigoberto Zetina Lezama¹, Gerardo Montiel Vicencio¹, Carlos Alberto Tinoco Alfaro¹ y Mónica Flores Ascención²

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, ² Universidad Tecnológica de Tecamachalco

RESUMEN

La demanda mundial de productos orgánicos se incrementa debido al interés por consumir alimentos sanos, obtenidos con tecnologías de bajo impacto ambiental. La piña aporta 20 millones de t al mercado mundial; sin embargo, se produce bajo esquemas convencionales y no más del 0.1% se produce con manejo orgánico. México, participa con un millón de t, pero la producción orgánica es incipiente, la tecnología escasa y no cubre la demanda del mercado. El objetivo fue determinar el crecimiento en cada órgano de la planta, hasta la inducción floral, con nutrición orgánica en suelo con cubierta plástica. El experimento fue establecido en mayo de 2017, en el Campo Experimental Cotaxtla del INIFAP. El diseño experimental fue bloques al azar en parcelas divididas con cuatro repeticiones; la parcela grande fue: suelo desnudo y cubierta plástica; la parcela chica tuvo: nutrición orgánica, con 15 t ha⁻¹ de bocashi, nutrición mineral y sin fertilización. Las variables fueron, peso fresco y seco de planta, hojas, tallo y raíces; volumen de raíces y clorofila. Se realizaron cinco muestreos desde la plantación hasta la inducción floral, en enero de 2018. Los resultados indicaron que las plantas con cubiertas plástica superaron estadísticamente ($p \leq 0.05$) al tratamiento con suelo desnudo en peso fresco y seco de planta, área foliar, índice de área foliar y clorofila; los tratamientos de cubierta plástica con nutrición mineral, cubierta plástica con nutrición orgánica y fertilización mineral en suelo desnudo fueron superiores estadísticamente ($p \leq 0.05$) al resto de los tratamientos en peso seco y fresco de planta, área foliar, índice de área foliar, contenido de clorofila y número de hojas. El peso de hojas, tallos y raíces en cubierta plástica fue superior, en 13.1%, 2.6% y 27.3% respectivamente, al suelo desnudo. El comportamiento entre el mineral y el orgánico fueron similares y superiores al testigo.

INTRODUCCIÓN

En Veracruz, Oaxaca y Tabasco se concentra aproximadamente el 93% de la superficie total nacional cultivada, son los principales exportadores de piña fresca convencional (no orgánica) y aportan un importante ingreso en divisas por ese concepto (SIAP, 2014). Sin embargo, en el contexto internacional, aun con casi 100 mil toneladas de piña fresca exportada, como cifra promedio anual en 2014, México como país tiene una muy baja participación en el mercado de exportación de piña fresca internacional, donde realmente destacan como los mayores proveedores mundiales Costa Rica (29%), Francia (12.8%) y Costa de Marfil (11.2%). En Latinoamérica las exportaciones están dirigidas principalmente a Estados Unidos de la siguiente forma: Costa Rica (81.5%), Honduras (11%), México (5.7%), Ecuador (0.9%) y Guatemala (0.1%) (CIMS, 2004). Además de la competencia entre países proveedores, debe considerarse también que otra limitante para la exportación de frutos, son los cambios actuales en los patrones de alimentación y hábitos de consumo de los mercados con poder adquisitivo, orientados al consumo de productos de buena calidad y producidos de manera amigable con el medio ambiente (Fletcher, 1997).

Bajo estas circunstancias, los países exportadores actualmente exigen tecnologías para producir frutos de piña libres de residuos de plaguicidas y aptos para certificación, y cumplimiento de normatividades de mercados europeos, japoneses y americanos, (Rebolledo., et al 2011); Amador, et al, 2002). Una alternativa que permitirá ofertar frutos libres de residuos químicos, es el sistema de producción orgánica, pues contempla en forma holística la utilización métodos agronómicos, biológicos y mecánicos para desempeñar cualquier función específica dentro del sistema productivo, a su vez la preservación de los recursos naturales, (Altieri, et al, 1995).

La Unión Europea (UE) es el mayor mercado del mundo para piña orgánica, con un consumo que superó las 2,000 toneladas anuales en 2002; en segundo lugar, se encuentran los Estados Unidos, con un consumo estimado en 1,000 toneladas. La tendencia, es que la demanda continuará

creciendo un 20% anual (CIMS, 2003). Actualmente, en 2014, la superficie dedicada a producir piña orgánica en Costa Rica, principal país exportador del mundo, alcanzó las 1,281 hectáreas con el híbrido MD-2, un año antes era de 991 hectáreas; con una producción estimada para 2016 y 2017 de 65,000 toneladas (EF, 2015).

La producción de piña en México bajo métodos convencionales, se caracteriza por ser extremadamente esquilante y contaminante del medio ambiente: genera una pérdida de 50 a 150 toneladas de suelo/ha por ciclo, dependiendo de la pendiente y precipitación ocurrida durante el periodo evaluado; la baja fertilidad y acidificación progresiva de los suelos, obliga a aplicar entre 3 y 5 toneladas/ha/ciclo de fertilizantes químicos, para lograr rendimientos rentables; además de acidificar el suelo, la falta de aprovechamiento total de estos insumos, contaminan los terrenos, cuerpos de agua superficiales y mantos freáticos del entorno (Rebolledo et al., 2011). Estas altas cantidades de insumos utilizados incrementan el riesgo de producir piña contaminada con residuos químicos y en consecuencia provocar daños a la salud del productor y consumidor; asimismo, causan un severo daño ambiental.

El crecimiento, desarrollo, rendimiento y la calidad de la piña se reduce cuando existe una disminución de agua en el suelo. La cubierta plástica se utiliza con el fin de regular estos efectos (Rebolledo et al., 2002). Estas cubiertas producen un efecto térmico en el suelo, debido a que las cubiertas no porosas anulan el componente de evaporación, transmiten una parte importante de la radiación solar al interior del suelo. Suelen elevar así la temperatura, permitiendo aplicaciones como acolchado. En franjas angostas se debe considerar la disminución de temperatura hacia los extremos, llamada efecto borde. La utilización de cubiertas plásticas supone alterar el balance de radiación, definiendo según el objetivo, un resultado más positivo o más negativo, el cual puede expresarse en mayor o menor temperatura en el suelo (Misle & Norero, 2002).

El abono orgánico Bocashi ha sido utilizado por los agricultores japoneses. Bocashi es una palabra japonesa que significa "materia orgánica fermentada". Su uso activa y aumenta la cantidad de microorganismos en el suelo, mejora sus características físicas y suple a las plantas con nutrientes. La composta tipo Bocashi se elabora con materiales locales, por lo que se pueden hacer variaciones de acuerdo con la materia prima disponible en la región. Este es una alternativa nutrimental para suelos y plantas ya que es fermentado en un proceso de semidescomposición aeróbica de residuos orgánicos por medio de poblaciones de microorganismos, en condiciones controladas, que producen un material parcialmente estable de lenta descomposición, capaz de fertilizar a las plantas y al mismo tiempo nutrir al suelo (Ramos & Terry, 2014).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el crecimiento de la piña en cada uno de sus órganos desde la plantación hasta la diferenciación floral en suelo con cubierta plástica y nutrición orgánica.

PARTE EXPERIMENTAL

El experimento estableció en el Campo Experimental Cotaxtla del INIFAP; ubicado en el municipio de Medellín, Veracruz, a 18° 16' L. N. y 96° 16' LW; a 40 de altitud; con clima AW0, el más seco de los subhúmedos, con temperatura promedio anual de 24 °c y 1200 mm anuales de precipitación de los cuales aproximadamente el 90 % caen de junio a noviembre; el resto se distribuye prácticamente entre diciembre y enero con un periodo prácticamente seco de febrero a mayo.

Se plantó la primera semana de mayo de 2018, con hijuelos, denominados "clavos", del híbrido MD-2, de 400 gramos en promedio. El experimento se estableció a una densidad de 50,000 plantas por hectárea, en arreglo espacial a "tres bolillo" con el sistema de camas meloneras. El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro repeticiones con arreglo de tratamientos en parcelas divididas: a) parcela grande; suelo desnudo y con cubierta plástica; b) parcela mediana; sin fertilizar (0-0-0), fertilización orgánica y mineral. Para la cobertura de suelo se utilizó plástico negro calibre 150, con lo cual se cubrió el 100% del suelo que correspondió a este tratamiento.

El tratamiento orgánico fue de 15 toneladas por ha de bocashi aplicadas al boleto; el tratamiento mineral fue de 12-8-12 g de nitrógeno, fósforo y potasio, por planta, respectivamente. El testigo no recibió aplicaciones de fertilizante. Las variables medidas fueron: peso fresco y seco de planta, hojas, tallos y raíces adventicias; volumen de raíces adventicias, área foliar, índice de área foliar, contenido de clorofila. Se realizaron cinco muestreos de crecimiento, 6 de mayo, 3 de agosto, 25 de septiembre y 30 de octubre de 2017; y en la iniciación floral, el 22 de enero de 2018. El muestreo de planta se hizo siguiendo la metodología de estaciones de crecimiento como lo indica Rebolledo, *et al.*, 2011.

La clorofila se midió con un Spad en el tercio medio de la hoja "D" en las siguientes fechas: 3 de agosto, 4 de septiembre, 25 de septiembre, 6 de noviembre y 11 de diciembre. El volumen se midió al sumergir las raíces en una probeta con agua anotando el volumen desaplazado. Se presentaron lluvias atípicas, del 1 de septiembre al 12 de octubre, de 685 mm.

RESULTADOS

Los resultados muestran que el crecimiento de la planta hasta la inducción floral fue superior cuando se establece con cubierta plástica en comparación con el tratamiento bajo suelo desnudo (Figura 1; error estándar). En esta misma variable, los tratamientos con cubierta plástica en los niveles de nutrición superaron a los ubicados con suelo desnudo, a excepción del tratamiento con fertilización mineral, quien se comporta igual que los acolchados (Figura 2; error estándar). Lo anterior se refuerza con los contenidos de clorofila en el tercio medio de la hoja "D", en donde el acolchado plástico también superó al suelo desnudo durante la etapa vegetativa del cultivo, como se puede observar en la Figura 3. En un contexto similar, los niveles de nutrición junto con la fertilización mineral tuvieron mayor concentración de clorofila en la hoja "D" como se muestra en la Figura 4 (error estándar). Estos resultados pueden evidenciar una mayor concentración de nitrógeno en las hojas y una mayor actividad fotosintética a favor de las cubiertas plásticas; después del cuarto mes, la concentración de clorofila cambia su comportamiento, lo cual se explica en razón de la inundación que sufrieron las plantas en octubre debido a las altas precipitaciones de casi 700 mm ocurridas en septiembre y octubre; en el quinto muestreo, las plantas se empezaron a recuperar.

Los tratamientos tuvieron similar comportamiento que en las variables anteriores en la medición del área foliar, lo que corrobora el hecho de una mayor tasa fotosintética en las plantas acolchadas, a excepción del tratamiento con plástico sin fertilización, pero incluyendo la fertilización mineral a suelo desnudo (Figuras 5 y 6 error estándar). En el número de hojas por planta, no se refleja claramente la diferencia entre tratamientos (Figura 7), lo que revela la producción de hojas más anchas y largas en los tratamientos que sobresalen en las variables de producción de biomasa. El índice de área foliar muestra las bondades que expresa el tratamiento con cubiertas plásticas, en función de la productividad de la planta, al producir mayor área foliar por el área de suelo ocupada por la planta (Figura 8).

En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos en relación con la biomasa de las hojas, los tallos y las raíces). El tratamiento con cubiertas plásticas supera al tratamiento a suelo desnudo (error estándar), situación que confirma la ventaja que representa el acolchado plástico, como una práctica agronómica viable para la nutrición orgánica en esta bromeliácea; lo mismo se demuestra en los tratamientos de nutrición (Figura 9 A y B). La mayor producción de biomasa de hojas se logra durante el tratamiento de inducción floral y al principio de la floración empieza a declinar al emplear la planta los fotoasimilados para el crecimiento y desarrollo del fruto.

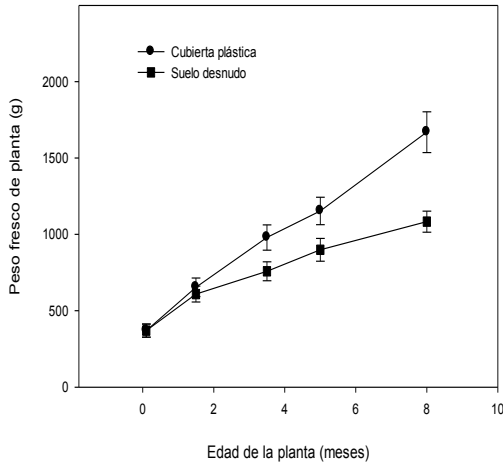


Figura 1. Crecimiento de planta de piña a suelo desnudo y con cubierta plástica en tres niveles de nutrición a la inducción floral. Barras \pm el error estandar.

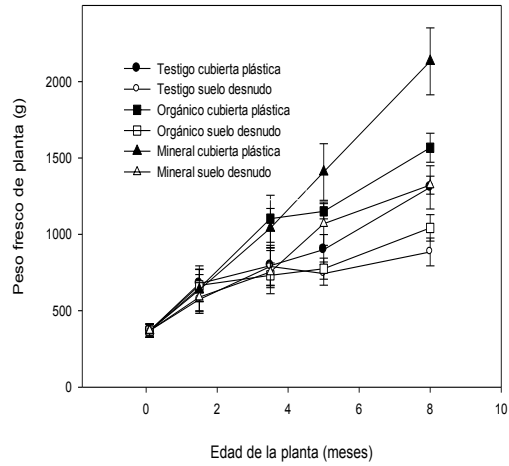


Figura 2. Crecimiento de plantas de piña en tres niveles de nutrición a suelo desnudo y con cubierta plástica, a la inducción floral. Barras \pm el error estandar.

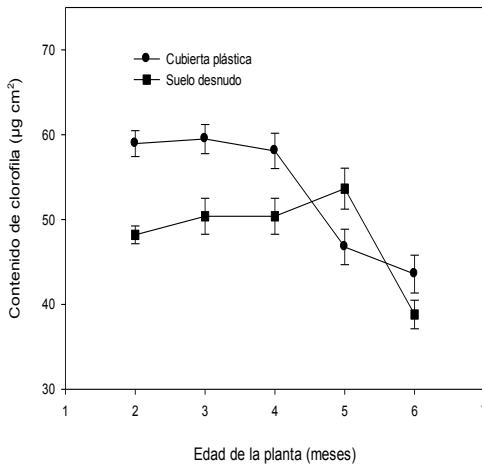


Figura 3. Contenido de clorofila en plantas de piña a suelo desnudo y con cubierta plástica en tres niveles de nutrición a la inducción floral. Barras \pm el error estandar.

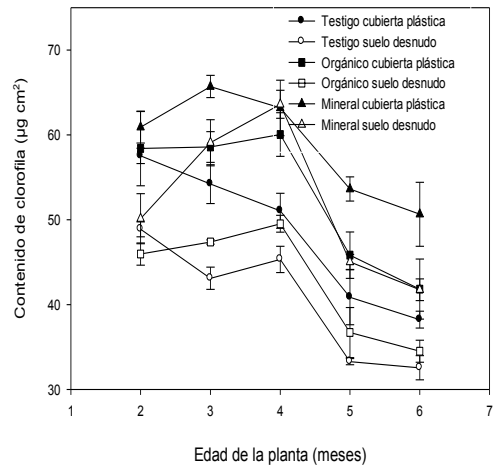


Figura 4. Contenido de clorofila de plantas de piña en tres niveles de nutrición a suelo desnudo y cubiertas plásticas. Barras \pm el error estandar.

La proporción del peso seco de las hojas es mayor que la biomasa de tallos; se observa que la caída del peso es mayor cuando la planta inicia su diferenciación lo que sugiere que el tallo empieza a agotar sus reservas para el desarrollo de la fruta; esta caída es menos drástica en el tratamiento con nutrición mineral. Se nota también la menor biomasa del tallo en relación con las hojas (Figura 9 C y D). El patrón del crecimiento en los tratamientos guarda un comportamiento similar que en la producción de hojas. Lo anterior coincide y se refuerza con la producción de biomasa de raíces adventicias (Figura 9 E y F); esto ayuda a explicar el mayor crecimiento ya que al haber más raíces enrolladas en la base del tallo, las planta tienen mayor capacidad de absorber agua y nutrientes; los resultados obtenidos en el volumen de raíces confirman lo expuesto (Figuras 10 y 11).

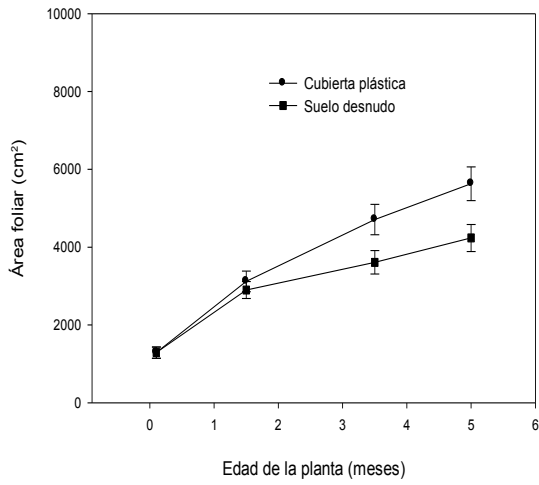


Figura 5. Área foliar en plantas de piña en dos sistemas a suelo desnudo y con cubierta plástica en niveles de nutrición antes de inducción floral. Barras representan el error estandar.

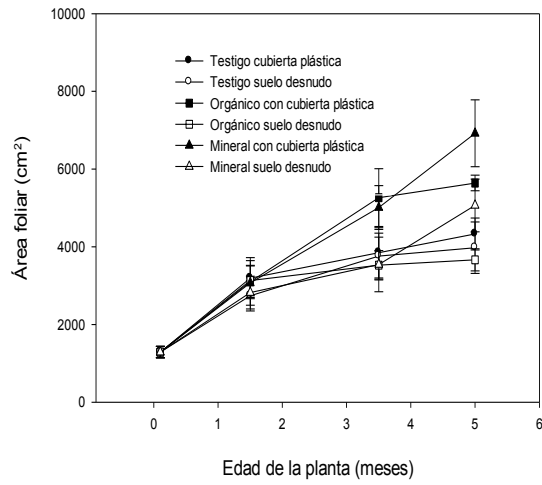


Figura 6. Área foliar en plantas de piña a suelo desnudo y con cubierta plástica en tres niveles de nutrición hasta antes de la inducción floral. Barras representan el error estandar.

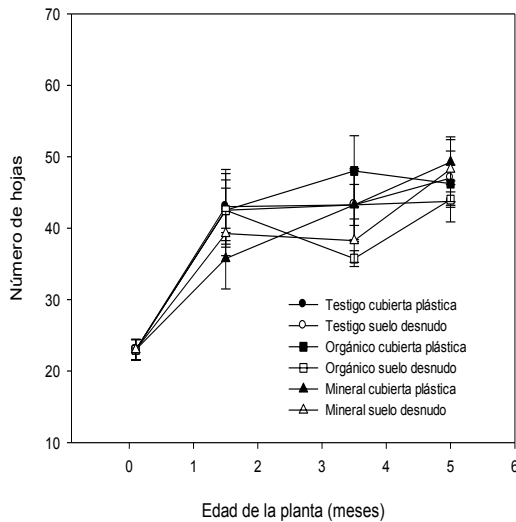


Figura 7. Producción de hojas de piña en suelo desnudo y con cubierta plástica en niveles de nutrición orgánica. Barras representan el error estandar.

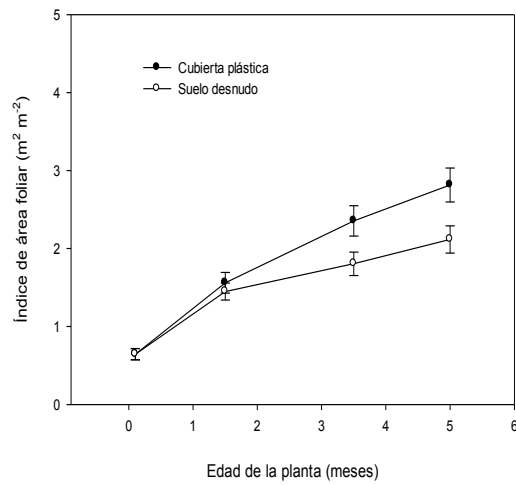


Figura 8. Índice de área foliar en dos sistemas de plantación de piña con nutrición orgánica. Barras representan el error estandar.

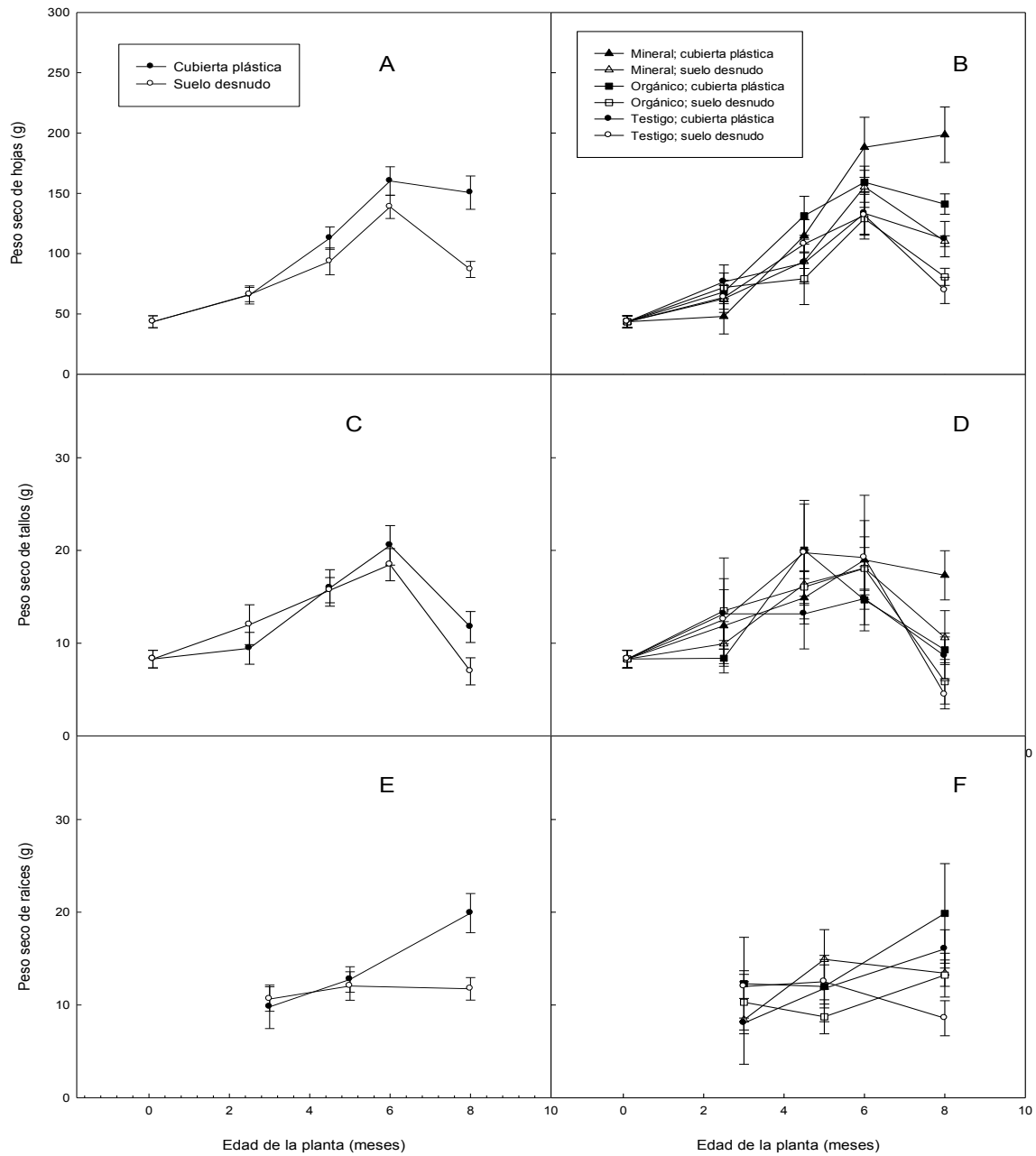


Figura 9. Peso seco de hojas (A, B), tallos (C, D) y raíces (E, F) de piñon hasta antes de la floración en suelo desnudo y con cubiertas plásticas con fertilización orgánica y mineral. Barras representan el error estándar.

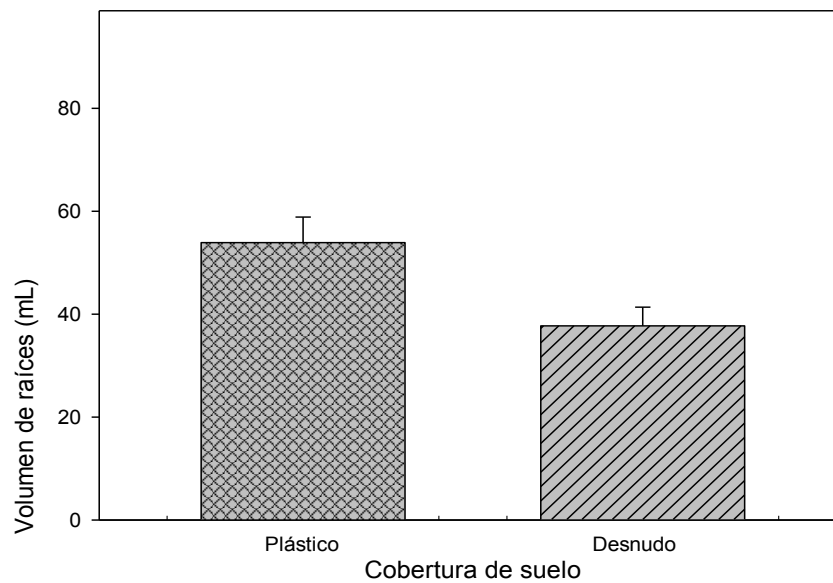


Figura 10. Volumen de raíces de piña en dos niveles de cobertura de suelo a la iniciación floral. Barras representan el error estándar.

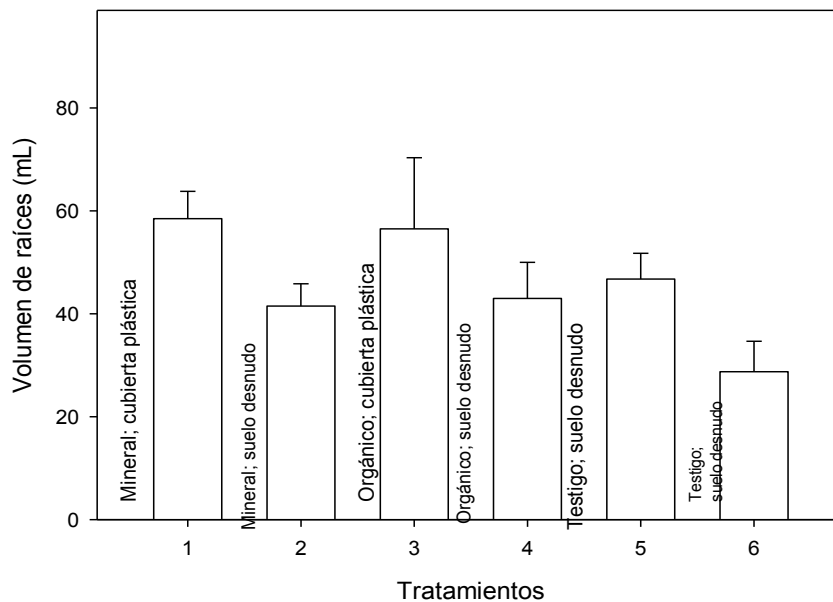


Figura 11. Volumen de raíces adventicias de piña en tres niveles de nutrición en suelo desnudo y con cubierta plástica. Barras representan el error estándar.

CONCLUSIONES

La práctica de la cubierta del suelo con plástico es una buena alternativa para la nutrición orgánica ya que produce mayor biomasa derivado de una mayor absorción nutrimental.

El patrón de crecimiento es similar en los tres órganos de la planta; sin embargo, la planta produce más hojas que tallos y raíces.

El tratamiento con nutrición orgánica en combinación con la cubierta plástica se encamina para ser una opción viable en los esquemas de fertilización, lo que ayuda a reducir el deterioro ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amador, M., P. Cussianovich, T. Saravi. 2002. Aproximación de la oferta centroamericana de productos orgánicos y situación de los mercados: regional. IICA: Agencia San José, Costa Rica. 36 p.
2. Altieri S., M.A., J. G. Farrell, S. B. Hecht, M. Liebman, F. Magdoff, B. Murphy, R. B. Norgaard y T. O. Sikor. 1995. Agroecology: the science of sustainable agriculture. 2a ed. Westview Press, Boulder, C. O. USA.433 p.
3. CIMS (Centro de Inteligencia sobre Mercados Sostenibles). 2003. Guía latinoamericana de productores y exportadores de frutas tropicales sostenibles. Perfil de mercado de piña sostenible. <http://www.cims-la.com>. Costa Rica.
4. CIMS (Centro de Inteligencia sobre Mercados Sostenibles). 2004. Perfil comercial de piña. San José, Costa Rica. En: <http://www.cims-la.com>. Fecha de consulta 10 de julio de 2005.
5. EF (El Financiero (de Costa Rica). 2015. http://www.elfinancierocr.com/economia-y-politica/produccion-organica-pina_0_725327486.html
6. Fletcher, R.J. (1997) Listing of potential new crops for Australia including numbers of publications world-wide. The University of Queensland Gatton.553 pp.
7. Misle A. E. & A. Norero S. (2002). Comportamiento térmico del suelo bajo cubiertas plásticas II. Efecto del polietileno transparente a diferentes profundidades. Agricultura Técnica. Vol. 62. N°1. 14 p.
8. Ramos A. D. & E. Terry A. (2014). Generalidades de los abonos orgánicos: Importancia del Bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. Cultivos Tropicales. Vol 35. N°4. 12 p.
9. Rebolledo M. A., L. del M. Ruiz P., A. E. Becerril R., R. Mosqueda V., A. Castillo M., L. Rebolledo M., D. Uriza A. (2002). Algunas características fisiológicas de tres cultivares de piña en dos sistemas de producción. Chapingo Serie Horticultura Vol. 8 N° 2 235-240 p.
10. Rebolledo, M. A., D. Uriza A., L. Rebolledo M. y R. Zetina L. 2011. Piña y su cultivo en México: Cayena Lisa y MD2. INIFAP. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo Experimental Cotaxtla. 304 p.
11. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Cierre de la producción agrícola por estado. En: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Fecha de noviembre de 2015.

CAPACIDAD GERMINATIVA DE SEIS ESPECIES FORRAJERAS DEL NORESTE DE MÉXICO, BAJO TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS

Lidia Rosaura Salas Cruz, Aleida Lizeth Medellín Pérez, Jesús Andrés Pedroza Flores, José Elías Treviño Ramírez y Maginot Ngangyo Heya

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. biolidiasalas@yahoo.com.mx

RESUMEN

La alta demanda de forrajes de buena calidad para satisfacer las necesidades del sector pecuario en el noreste de México, ha generado un amplio mercado de semillas forrajeras con el fin de abastecer la producción nacional. Para incrementar esta producción, es importante considerar las características fisiológicas de estas semillas a través de su capacidad germinativa, pues de esta manera se puede garantizar el desarrollo de la planta y reducir costos de producción. El objetivo del presente trabajo fue conocer la capacidad germinativa de seis especies con potencial forrajero: *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit., *Desmanthus illinoensis* MacMill., *Eragrostis curvula* Nees, *Bouteloua curtipendula* Torr., *Acacia berlandieri* Benth. y *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths, analizando el efecto de tratamientos pre-germinativos bajo condiciones de laboratorio. Los tratamientos fueron: 1) inmersión en agua a 90°C por 8 segundos, 2) inmersión en ácido sulfúrico al 5% por 8 segundos, 3) oscuridad por 7 días, y 4) irradiación con luz UV por 7 días; además del control (semillas sin pretratamiento). La especie que obtuvo el mayor valor de germinación fue *Eragrostis curvula* con 92 ± 0.82 % al irradiar las semillas con luz UV previo a la germinación, seguida por *Bouteloua curtipendula* (94 ± 0.58 %, con el tratamiento de agua caliente). *Bouteloua gracilis* registro bajos valores de germinación en los diferentes tratamientos (8-25%) y el control registró el mayor porcentaje (34 ± 1.29 %). Los resultados demuestran el fototropismo negativo en *L. leucocephala* y *D. illinoensis*. En conclusión, es posible incrementar los porcentajes de germinación en especies de gramíneas y leguminosas de importancia forrajera mediante la aplicación de luz UV, oscuridad y escarificación térmica en cinco de las seis especies evaluadas.

INTRODUCCIÓN

La vegetación del noroeste de México presenta un gran número de especies nativas de importancia económica. Por lo cual es deseable el uso de estas especies autóctonas para recuperar la cubierta vegetal y aprovechar su aporte a la sustentabilidad (Melgoza-Castillo et al. 2007, Jurado et al. 2009). Además de estar adaptadas a las condiciones ambientales de la zona, lo cual hace posible aprovechar los procesos sucesiones naturales que llevan al restablecimiento de la vegetación original (Martínez-Pérez et al. 2006, Sosa et al. 2014).

La capacidad germinativa y el vigor son los principales atributos involucrados dentro del componente de calidad fisiológica en semillas. El concepto de vigor en semillas es un tanto complejo, sin embargo, en forma general se podría decir que es el potencial biológico de la semilla que favorece un establecimiento rápido y uniforme bajo condiciones incluso desfavorables en campo.

Es importante considerar las características de calidad de la semilla antes de la siembra, al respecto, la calidad es el conjunto de características de un producto que evalúan el consumidor para saber si satisface sus expectativas y necesidades. Los atributos de calidad de las semillas son genéticos, fisiológicos, físicos y sanitarios. Son cualidades que se deben reunir en un conjunto y no en forma aislada; es fundamental para conseguir un buen establecimiento de plantas y es el primer paso para lograr un cultivo óptimo (Arango et al., 2001).

Aguado et al. (2004), recalca que desde su origen el principal uso que se le ha dado a la familia de las gramíneas ha sido como fuente de forraje para el ganado, y es precisamente eso lo que las convierte en un grupo de plantas muy importante para el hombre, así como para la protección del suelo evitando la erosión,

TEORÍA

Jiménez (2005) menciona que la familia de los pastos o zacates es una de las más grandes y juegan un papel importante en condiciones de pastoreo en zonas áridas y semiáridas del país. La cubierta vegetal que producen, disminuye la erosión y escorrentía del agua de lluvia. Las gramíneas nativas en términos generales son de bajo valor nutritivo por lo que no proporcionan la cantidad de nutrientes

adecuados para mantener buenos parámetros productivos y reproductivos en las explotaciones bovinas con poca aplicación de tecnología, por lo que es necesario el uso de fuentes alternas de nutrientes (UGRJ, 2011).

La inducción de pastos de otras zonas es recomendada por Esqueda y Carrillo (2001), debido a que realizaron un experimento comparando pastos nativos contra inducidos y obtuvieron que los pastos introducidos superaran más del 300% la producción de forraje. Otra ventaja de los pastos introducidos, es su capacidad de rebrotar durante la primavera, así como tener mayor tolerancia al pastoreo.

Las especies arbustivas introducidas presentan estructuras comestibles durante la mayor parte del año, pero las nativas pierden las hojas y rebrotan con las primeras lluvias efectivas. Mientras que los arbustos introducidos disponen de forraje comestible en cualquier época del año, pero pueden ser utilizados solo una vez al año (Azocar, 2000).

A su vez Esqueda et al. (2002) refieren que la resiembra es una práctica importante para la recuperación de pastizales deteriorados. Pero debido a su alto costo, es necesario cubrir los requerimientos de contar con semilla de rápida germinación y crecimiento de raíz y parte aérea. Por su parte, Hernández et al., (2004) mencionan que en la economía de algunos países juega un papel importante, como en Estados Unidos, el monto de venta de semillas de pastos para forrajes y césped ocupa el segundo lugar solo después de la semilla del maíz híbrido.

Los diversos tipos de pastos tienen tiempos diferentes en cuanto a la germinación, tal como lo mencionan Hernández et al., (2015); sin embargo, la germinación puede verse afectada además por la aplicación de fertilizantes los cuales permiten incrementar la producción de la semilla, así como su porcentaje de germinación y por lo tanto la producción de forraje de pastos nativos o introducidos, tal como lo mencionan Sáenz et al. (2015), que registraron diferencias en cuanto a la fertilización en cada una de las especies (zacate navajita, banderita, gigante, buffel y garrapata) con las que trabajaron. Se obtuvieron resultados diferentes en las tres variables de evaluación, de tal modo que la selección del mejor tratamiento depende de conjuntar las respuestas productivas con los costos de cada una de las opciones de fertilización evaluadas (Sáenz et al., 2015).

Esqueda y Carrillo (2001) reportaron que el zacate llorón (*Eragrostis curvula* L.) es una gramínea adaptada a condiciones de sequía, son zacates amacollados, perennes, con crecimiento en primavera-verano, se establece en sitios con elevación de hasta 1400 msnm se adaptan bien a sitios con rangos de precipitación en verano entre 200 a 350 mm y en suelos con Ph de 6 a 8, bien drenados y con textura arenosa. Coria et al., (2008). Lo consideran como una pastura perenne estival con cualidades adaptativas, que lo destacan en las regiones semiáridas. Tiene un poderoso sistema radicular, alta fijación de suelo erosionable, alta perennidad, resistencia a plagas y enfermedades y alta capacidad de producción de forraje. Su exitosa distribución se debe a la morfología de sus semillas, que favorecen su dispersión, alta capacidad reproductiva, y su elevada tolerancia a diferentes tipos de restricciones ambientales. (Aguado et al., 2004).

PARTE EXPERIMENTAL

Ubicación del área de estudio.

La investigación se realizó en las instalaciones del campus “La Ascensión” de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el municipio de Aramberri, Nuevo León, ubicada al sur del estado.

Las pruebas de calidad de germoplasma se desarrollaron en laboratorio de biología del campus académico experimental “La Ascensión” (Fig. 1).



Figura 1. Ubicación del área de estudio en Aramberri, Nuevo León, México.

Las especies seleccionadas por el alto potencial que presentan para su uso en la resiembra de pastizales fueron: Leucaena (*Leucaena leucocephala*), Huizachillo (*Desmanthus illinoensis*), zacate garrapata (*Eragrostis curvula*), zacate navajita (*Bouteloua gracilis*), zacate banderita (*Bouteloua curtipendula* (Mich. Torr.), Guajillo (*Acacia berlandieri*).

Porcentaje de Germinación (PG). La calidad fisiológica se determinó en el laboratorio con la prueba de germinación estándar. Siguiendo las indicaciones de ISTA (2013), Esta se realizó en cajas Petri donde se depositaron 25 Semillas de cada especie, se colocaron 4 repeticiones que representaron el 100% (Fig. 2), estas semillas se regaron diariamente con agua destilada, para evitar cualquier contaminación o adición de sales, registrándose diariamente el número de semillas germinadas. La duración de los ensayos se definió, como el periodo cuando se alcanzó la máxima tasa de germinación (entre 10 y 20 días dependiendo de la especie basado en un estudio preliminar) continuándose el monitoreo por cinco días más.

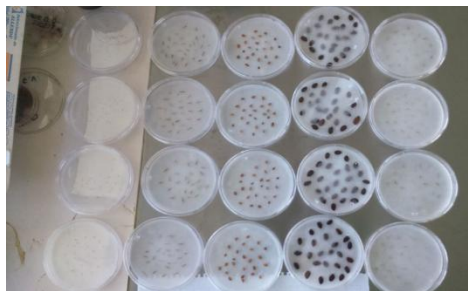


Figura 2. Cajas petri para prueba de germinación en cámara bioclimática.

La velocidad de germinación (M), definida como la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación, se calculó de acuerdo con González-Zertuche y Orozco-Segovia (1996) mediante la ecuación:

$$VG = \frac{\sum C_i \times 100}{\sum C_i T_i}$$

Donde:

VG = velocidad de germinación;

C_i = número de semillas germinadas en el día

T_i = tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

Tratamientos pregerminativos

Oscuridad. Se colocaron 100 semillas de cada una de las diferentes especies en cajas petri cubiertas con papel aluminio para evitar el paso de luz, en una germinadora Biotronette mark III modelo 846 por siete días a 28°C. Se regaron diariamente con agua destilada, para evitar cualquier

contaminación o adición de sales, registrándose diariamente el número de semillas germinadas. La duración de los ensayos fue definida, como el periodo cuando se alcanzó la máxima tasa de germinación (entre 10 y 20 días dependiendo de la especie basado en un estudio preliminar) continuándose el monitoreo por cinco días más.

Agua caliente. Se colocaron las semillas en un recipiente en una proporción de cuatro a cinco veces su volumen de agua caliente a temperatura entre 90 y 100°C. De inmediato se retira del fuego y las semillas se dejan remojar durante 8 segundos en el agua una vez transcurrido este tiempo se enjuagan en agua a temperatura ambiente, después se procedió a la colocación en cajas Petri se depositaron 25 semillas de cada especie se hicieron 4 repeticiones que representaron el 100 % para posteriormente ponerlas en la germinadora aplicándoles diariamente agua 5 ml y registrándose diariamente el conteo.

Exposición a luz UV. Se colocaron las semillas en una caja donde solo recibían luz UV en un periodo de 24 horas, después se procedió a la colocación en cajas Petri se depositaron 25 semillas de cada especie se hicieron 4 repeticiones que representaron el 100 % para posteriormente ponerlas en la germinadora aplicándoles diariamente agua 5 ml y registrándose diariamente el conteo.

Escarificación química con ácido (H_2SO_4). El ácido sulfúrico es uno de los métodos químicos más usados en especies forrajeras tropicales, ya que, disuelve, resquebraja y debilita las cubiertas de la semilla, lo que permite la imbibición y el intercambio gaseoso, facilita la división y expansión de la plúmula y la radícula del embrión (Hernández, 2010). Primeramente se procedió a la preparación del ácido sulfúrico, se colocó agua destilada en un vaso de precipitado de 50 ml, se agregó la cantidad de 5 ml de ácido una vez ya tenido la solución se procedió a la colocación de las semillas, se sumergieron por 1 minuto en ácido sulfúrico al 5 %, se sacaron y se lavaron con agua por un lapso de tiempo de 5 minutos una vez terminado se procedo a la colocación de las semillas en cajas Petri asiéndose 4 repeticiones con 25 semillas que representaron el 100%. De cada tratamiento de inmersión, incluyendo el testigo, se seleccionaron aleatoriamente 100 semillas y se colocaron en las bandejas de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

Diseño experimental. Para el presente trabajo en cada una de las pruebas realizadas se utilizaron seis especies con cuatro repeticiones por tratamiento y con 25 semillas por repetición. Los tratamientos fueron distribuidos bajo un arreglo completamente al azar.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza para detectar diferencias significativas entre tratamientos y entre las especies evaluadas, así como una comparación múltiple de medias por Tukey para identificar grupos estadísticamente similares. Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS ver. 10.

RESULTADOS

Germinación. La especie que obtuvo el mayor valor de germinación fue *Eragrostis curvula* con un 83% obtenido al día 15 después de la siembra, seguida por *Desmanthus illinoensis* con un 72%. Las especies *Bouteloua gracilis* y *Bouteloua curtipendula* registraron un comportamiento similar durante los 15 días de la evaluación y la especie *Leucaena leucacephala* registró el más bajo valor de germinación con un 11% (Fig. 3).

Carrillo et al. 2009, encontraron en *Eragrostis superba* un porcentaje de germinación aproximado de 90 %; sin embargo, no registraron diferencia significativa ($P>0.05$) en la germinación en diversas especies como, *B. gracilis* y *B. curtipendula*, pero la especie que registro el menor porcentaje de germinación (<5 %) fue *E. lehmanniana*.

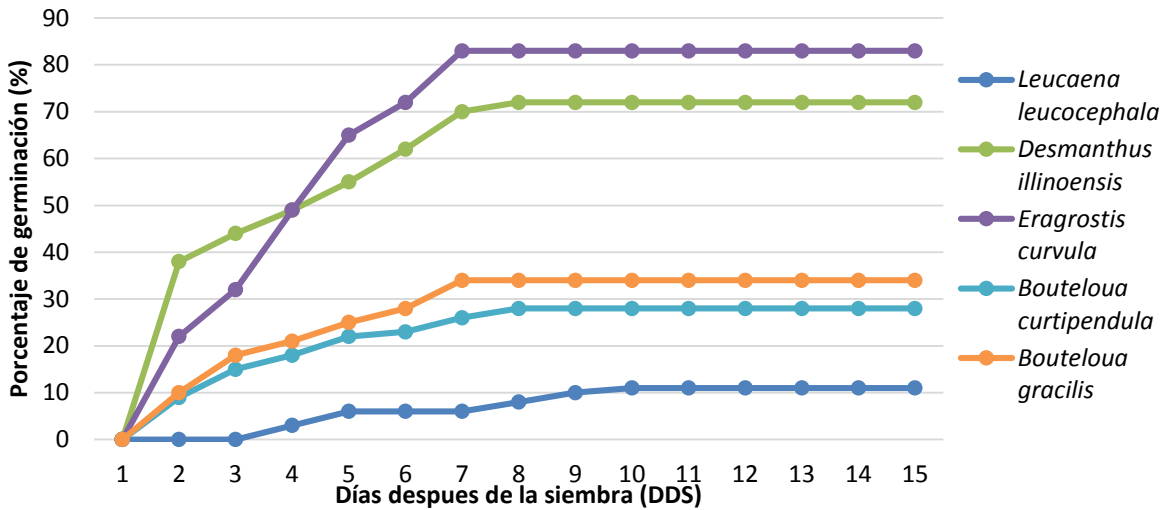


Figura 3. Curvas de germinación bajo condiciones controladas, para cinco especies de importancia forrajera.

Tratamientos pregerminativos

En todos los tratamientos utilizados para *Leucaena leucocephala*, la germinación empieza a observarse a los tres a cuatro días después de la siembra, con diferencias significativas en los resultados obtenidos, como se puede ver en la figura 4. Este resultado corrobora lo reportado en la literatura, ya que se considera a *L. leucocephala* como una especie de rápida velocidad de germinación, que se inicia a los 3 días y se completa a los 8 días, tal como lo comenta Zárte (1987). La mayor tasa de germinación se registró a los ocho días con un valor de 65 % en la oscuridad, mientras que en agua caliente al igual que en luz UV y para el testigo, la mayor tasa se registró a los 10 días, con los valores de 30, 10 y 10%, respectivamente. En el ácido sulfúrico, el mayor porcentaje de germinación se registró a los 7 días, con el valor de 12%. Solo el porcentaje registrado en oscuridad se encuentra dentro del rango de 50 a 80 % reportado por Zárte (1987) para *L. leucocephala* entre los primeros 6 y 8 días, con la indicación que se puede lograr una germinación del 80 al 90 %. Los porcentajes obtenidos en los demás tratamientos, al igual que en el testigo, son muy inferiores a lo que reportado en la literatura mencionada.

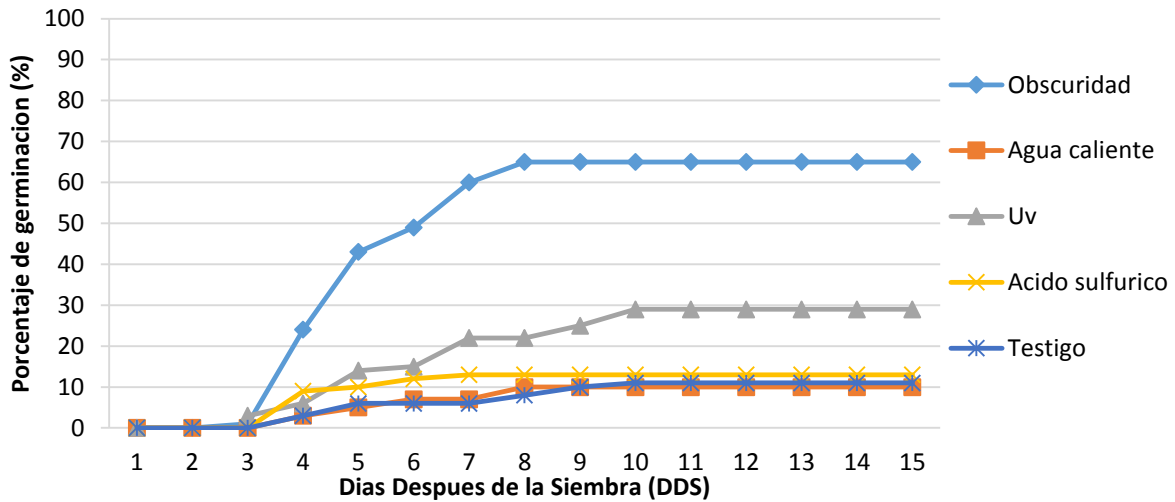


Figura 4. Curvas de germinación para *Leucaena leucocephala* en diferentes tratamientos pregerminativos durante 15 días.

Comparado con el tratamiento control de la presente investigación, la oscuridad suele incrementar la germinación en *L. leucocephala*, al igual que disminuye el tiempo necesario para la germinación. En cuanto al agua caliente, no tuvo un efecto en el proceso de germinación de *L. leucophala*, ni en su porcentaje y tampoco en el tiempo (velocidad de germinación). Esto no coincide con Sánchez-Paz y Ramírez-Villalobos (2006), quienes registraron el mejor resultado (91,5%) con agua caliente, atribuyéndolo a que la alta temperatura favorece la eliminación de la impermeabilidad de la cubierta seminal como lo indica Cobbina et al. (1990), lo que ocasiona mayor ruptura de la testa, entrada de agua e intercambio gaseoso, necesarios para la germinación (Villalobos et al., 1987), y, por ende, permitió mayor emergencia del embrión. De la misma manera, Lulanda (1981) logró incrementar la germinación en semillas de *Leucaena* al tratarlas con agua caliente a 90°C, mientras que González y Mendoza (1995) indicaron que el agua caliente permitió mayor velocidad de germinación y eliminó completamente la latencia en las semillas de *Leucaena*, empleando agua a 80°C por 5 min. De ahí, se puede decir que el tiempo de inmersión el agua caliente (ocho segundos), no fue suficiente para la ruptura de la testa, por lo que no produjo efecto en la velocidad de germinación, ya que las semillas de *L. leucocephala* presentan una gran latencia física por su cubierta impermeable, por lo que tienen una longevidad que oscila entre los 3 y 15 años, según Zárate (1987). Por otra parte, podría ser que la ebullición del agua a 100°C ocasionó un efecto inhibitorio en la germinación de las semillas.

Para el ácido sulfúrico, no se presentó un efecto significativo en el porcentaje de germinación, ni tampoco en el tiempo de germinación. Esto se debería a que la escarificación en ácido puede ocasionar resultados adversos (Balocchi et al. 1998). Ya que las semillas tratadas con H₂SO₄ pudieron sufrir daños del tegumento, o éste no puede ser lo bastante duro para impedir la penetración del ácido y el daño del embrión (Skerman et al. 1991), aunque también se ha observado la eliminación del tegumento de las semillas, lo que causó daños al embrión y como consecuencia alto porcentaje de semillas muertas (Sanabria et al. 2004).

En cuanto a *Desmanthus illionensis*, la curva de germinación de la Figura 5 hace ver una respuesta positiva desde el segundo día después de la siembra en todos los tratamientos, con los valores de 38, 48, 48, 48 y 59 %, para el testigo, luz UV, agua caliente, oscuridad y ácido sulfúrico, respectivamente. El mayor porcentaje se registró a los 7 días, presentándose el tratamiento "oscuridad", el único que tuvo un efecto en la tasa de germinación de *D. illionensis* comparado con el testigo, alcanzándose más del 80%, mientras que los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas con el testigo, registrándose los valores de 68 a 72 %.

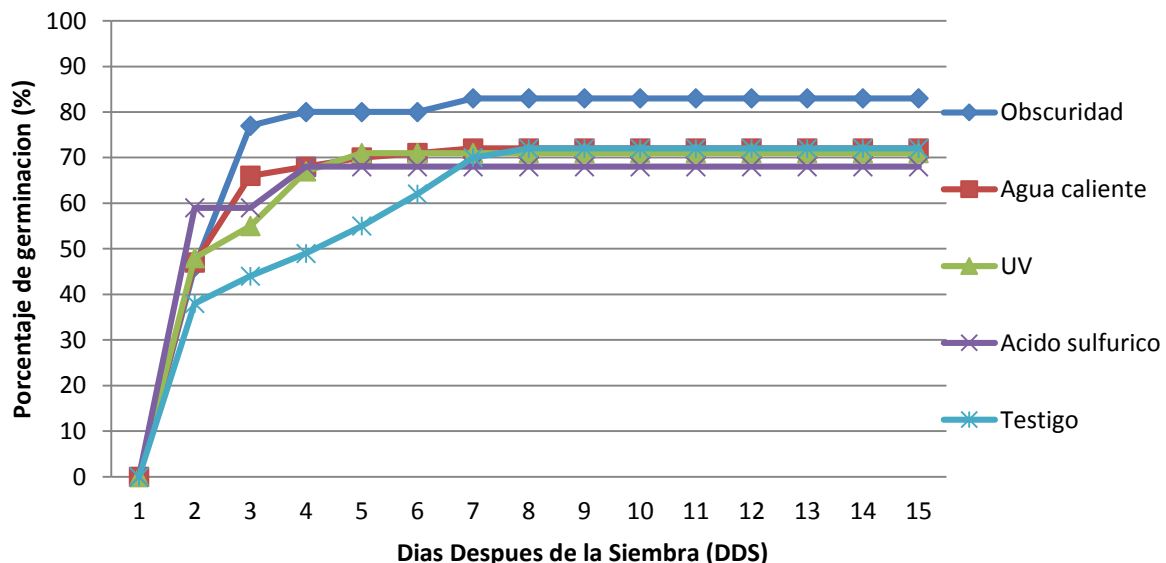


Figura 5. Curvas de germinación para *Desmanthus illionensis* en diferentes tratamientos pregerminativos durante 15 días.

Goggin y Powles (2012), mencionan que para que ocurra el rompimiento de la latencia se requiere un periodo de inhibición en la oscuridad. Esto podría justificar el mejor resultado obtenido en oscuridad para *D. illionensis*. Estos resultados concuerdan con los reportados por Kepczynski y Sznigir (2013) quienes observaron efecto de germinación en las semillas de *Amaranthus* en oscuridad de 35 a 40 °C.

Para *Eragrostis curvula*, la germinación se inició desde el segundo día en luz UV al igual que en el testigo, con los porcentajes de 64 y 22 %, respectivamente, mientras que se observó a partir del tercer día para ácido sulfúrico, oscuridad y agua caliente, con los valores de 50, 55 y 64 %, respectivamente (Fig. 6).

El mayor porcentaje se registró al cuarto día en oscuridad (70%) y en agua caliente (86%), mientras que fue al quinto día para ácido sulfúrico (91%), y el sexto y séptimo día para luz UV (92%) y testigo (87%), respectivamente. Para esta especie, el tratamiento oscuridad presentó el menor porcentaje de germinación comparado al testigo, relevando de esta forma, el efecto negativo de la oscuridad en la germinación de dicha especie. Los demás tratamientos presentaron un efecto levemente positivo en la germinación, comparado al testigo.

Cabe señalar que los presentes resultados muestran que *E. curvula* germina muy rápido (desde el segundo día), presentado altos porcentajes de germinación, en comparación a las demás especies evaluadas.

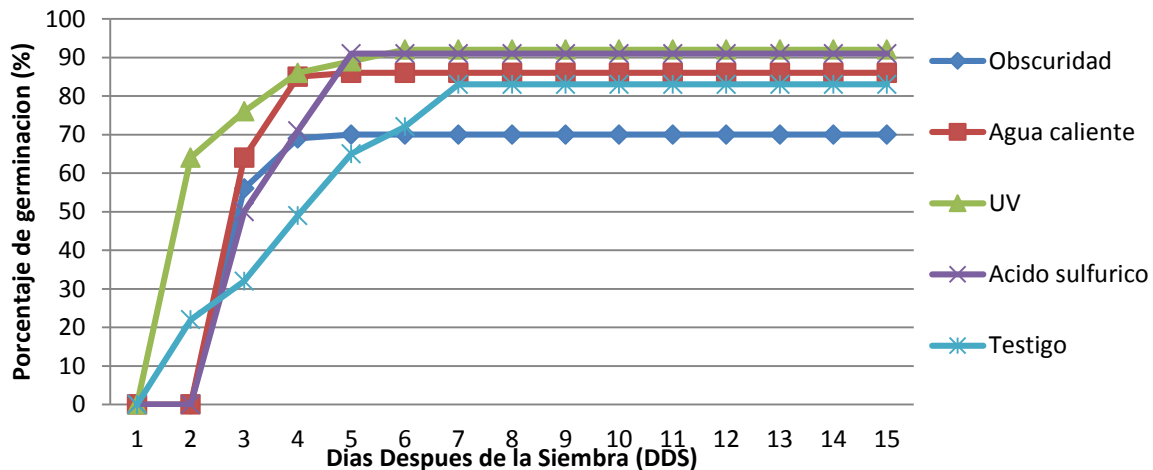


Figura 6. Curvas de germinación para *Eragrostis curvula* en diferentes tratamientos pregerminativos durante 15 días.

La figura 7 presenta el registro de la germinación de *Bouteloua curtipendula* desde el día 2, para el testigo (9%), agua caliente (22%) y luz UV (55%) al día 3 para oscuridad (15%) y ácido sulfúrico (34%), presentándose el mayor porcentaje en agua caliente (94%) y ácido sulfúrico (68%) al sexto día, luz UV (94%), oscuridad (94%) y testigo (94%), al octavo día. Se puede notar aquí, un efecto altamente positivo de todos los tratamientos en la germinación, comparado a al testigo, con porcentajes de más de 90% para agua caliente, luz UV y oscuridad, y de casi 70% para ácido sulfúrico. Eso deja ver que la importancia de los tratamientos pre germinativos para *B. curtipendula*, ya que ayudan a mejorar sustancialmente su poder germinativo.

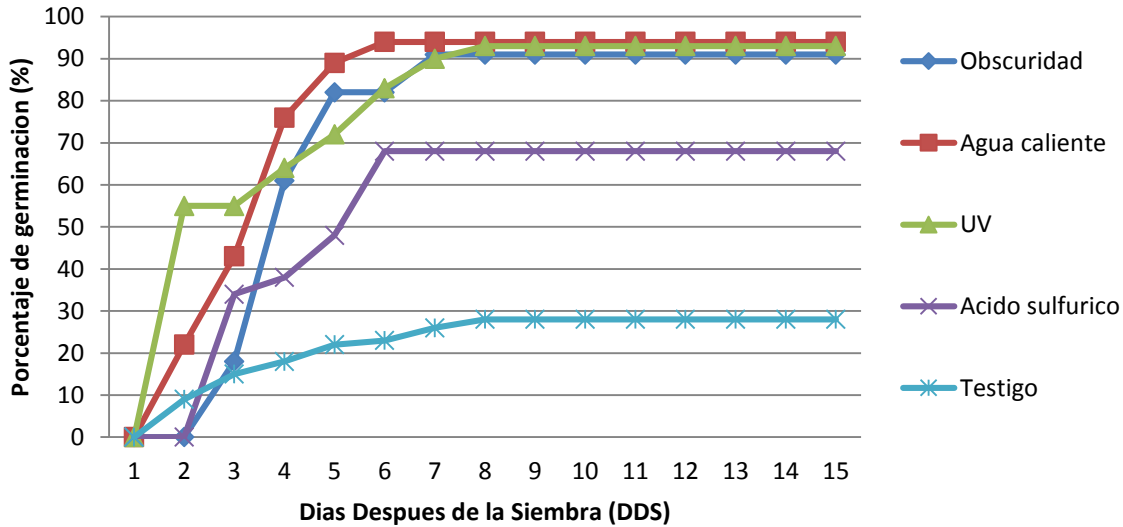


Figura 7. Curvas de germinación para *Bouteloua curtipendula* en diferentes tratamientos pregerminativos durante 15 días.

Para *Bouteloua gracilis*, todos los tratamientos presentaron porcentajes de germinación por debajo del testigo, con valores máximos de 8, 16, 19 y 25 % para oscuridad, luz UV, ácido sulfúrico y agua caliente, respectivamente, mientras que el testigo registro el valor máximo de 34% (Fig. 8). Esto sugiere que no es apropiado aplicar tratamientos pre germinativos para *B. gracilis*, o al menos los que se estudiaron.

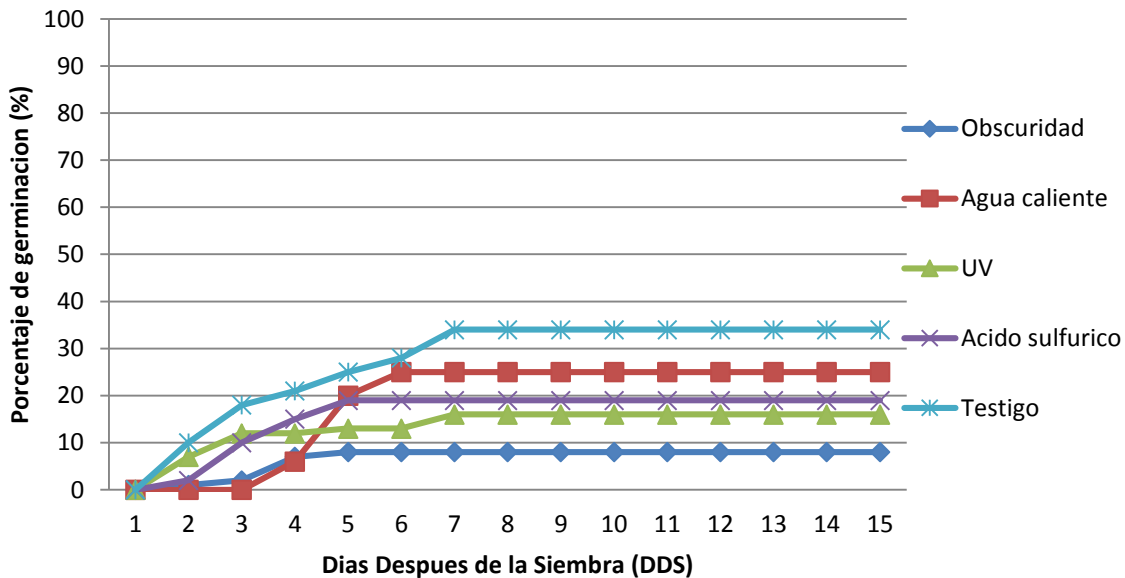


Figura 8. Curvas de germinación para *Bouteloua gracilis* en diferentes tratamientos pregerminativos durante 15 días.

Al igual que en el caso anterior, los tratamientos pre germinativos presentaron porcentajes de germinación por debajo del testigo, con valores máximos de 46, 58, 60 y 68 % para ácido sulfúrico, agua caliente, luz UV y oscuridad, respectivamente, mientras que fue de 85 % para el tratamiento control (Fig. 9). Sin embargo, los porcentajes registrados en este caso, son superiores a lo que se observa con *B. gracilis*. Además, a los dos días, se registró germinación en todos los tratamientos para *A. berlandieri*.

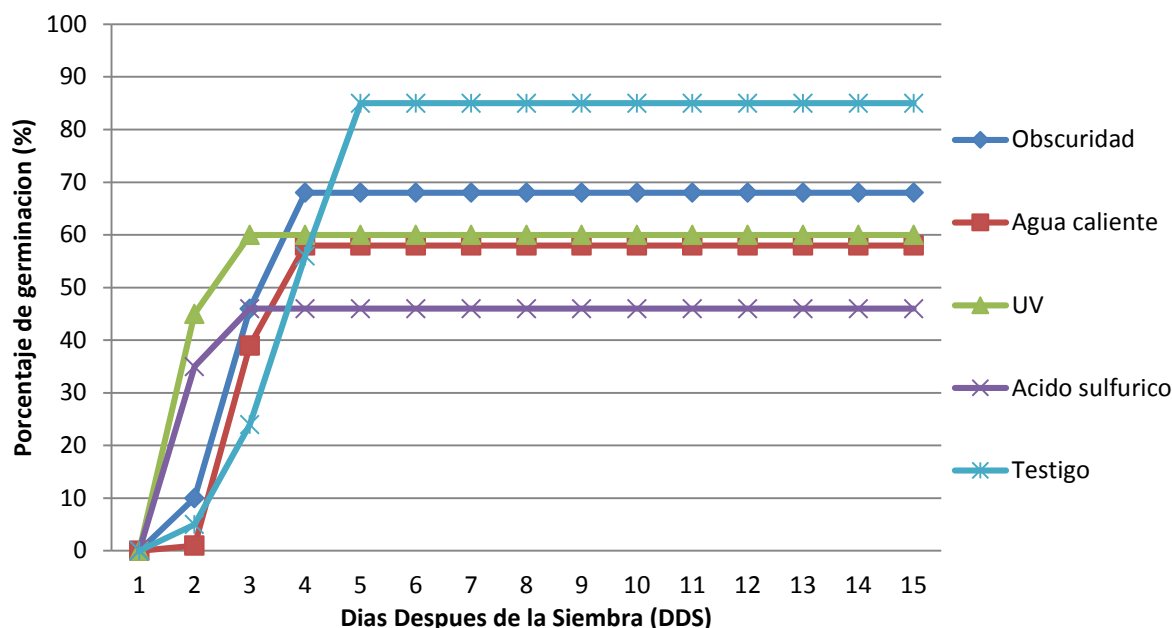


Figura 9. Curvas de germinación para *Acacia berlandieri* en diferentes tratamientos pregerminativos durante 15 días.

CONCLUSIONES

Las pruebas fisiológicas de las semillas evaluadas mostraron resultados diferentes, que permitieron determinar la especie que presentó mejor calidad para su establecimiento en praderas.

Hubo mejor germinación en los tratamientos de oscuridad y con luz ultravioleta, presentándose la especie *Eragrostis curvula* con el mayor porcentaje de germinación tanto en oscuridad como en luz UV continua, por lo que se concluye que la luz puede ser un factor que promueva o inhiba la germinación de las semillas de algunas especies, de acuerdo a su intensidad, duración y calidad, sin embargo, las semillas de algunas especies germinan indistintamente en luz y en oscuridad.

Con dichas conclusiones, se aprueba la hipótesis de que por lo menos alguno de los materiales genéticos utilizados para dicha investigación dentro de laboratorio contaría con atributos de calidad fisiológica; siendo este el zacate llorón (*Eragrostis curvula* L.) cuyos resultados en los diversos análisis demuestran un alto poder germinativo y un vigor excelente dentro de las semillas de gramíneas forrajeras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aldezabal, A., García-González, R., Gómez, D., & Fillat, F. (2002). El papel de los herbívoros en la conservación de los pastos. *Revista Ecosistemas*, 11(3).
2. Álvarez-Holguín, A., Morales-Nieto, C. R., Corrales-Lerma, R., Melgoza-Castillo, A., & Méndez-Zamora, G. (2017). Germinación de genotipos de pasto banderita (*Bouteloua Curtipendula*) bajo diferentes presiones osmóticas. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(10), 161-168.
3. Borrajo, I.C. 2006. Importancia de la calidad de semillas. Curso internacional de ganadería bovina subtropical. Sitio argentino de producción animal. Pp. 2,4-6.
4. Coronado, M. H. E., & Romo, R. L. C. (2012). Producción de forraje y carne en pastizales resembrados con gramíneas introducidas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 39(2).
5. Carrillo Romo, R. L., & Esqueda Coronado, M. H. (2001). Producción de forraje y carne en pastizales resembrados con gramíneas introducidas. *Técnica Pecuaria en México*.
6. Carrillo Romo, R., Esqueda Coronado, M. H., Jiménez Castro, J., Melgoza Castillo, A., & Sosa Cerecedo, M. (2005). Emergencia y sobrevivencia de gramíneas con diferentes secuencias de humedad/sequía en tres tipos de suelo. *Técnica Pecuaria en México*.

7. Jurado, G. P., Domínguez, C. H., Melgoza, C. A., & Morales, N. C. (2011). Emergencia y crecimiento del zacate banderilla con biosólidos en condiciones de sequía. *Tecnociencia Chihuahua*, 6, 57-67.
8. Montaño, N. M., Ayala, F., Bullock, S. H., Briones, O., García-Oliva, F., García-Sánchez, R., & Troyo, E. (2016). Almacenes y flujos de carbono en ecosistemas áridos y semiáridos de México: Síntesis y perspectivas. *Revista Terra Latinoamericana*, 34(1), 39-59.
9. Moreno-Gómez, B., García-Moya, E., Rascón-Cruz, Q., & Aguado-Santacruz, G. A. (2012). Crecimiento y establecimiento de plántulas de *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths y *Eragrostis curvula* var. *conferta* Stapf bajo un régimen simulado de lluvia. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(4), 299-308.
10. Nieto, C. R. M., Carrillo, A. Q., Castillo, A. M., Salvador, M. M., & Guerra, P. J. (2012). Diversidad forrajera del pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], en poblaciones de zonas áridas y semiáridas de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 47(3), 231-244.
11. Pérez, A. S., & Cháirez, F. G. E. (2002). Caracterización hidrológica de un agostadero comunal excluido al pastoreo en Zacatecas, México. I. Pérdidas de suelo. *Téc Pecu Méx*, 40(1), 37-53.
12. Quero-Carrillo, A. R., Hernández-Guzmán, F. J., Velázquez-Martínez, M., Gámez-Vázquez, H. G., Landa-Salgado, P., & Aguilar-López, P. (2016). Métodos de establecimiento de pasturas en zonas áridas de México utilizando semillas crudas o cariósides. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 4(1), 29-37.

OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MALTEO PARA LA PRODUCCIÓN DE MALTA DE CALIDAD EN UNA CEBADA DE LA REGIÓN DE MICHOACÁN

José Francisco Lázaro Luna, Rosa María García Martínez.

Facultad de Químico Farmacobiología UMSNH. Morelia, Michoacán.

RESUMEN

El malteado es el primer paso en la elaboración de cerveza y es el proceso por cual se obtiene la materia prima principal, la malta. En este, se produce la germinación controlada de un cereal, seguida por la interrupción de este proceso natural, secando el grano por medio de calor. Los granos a usar va desde el trigo, maíz, sorgo, etc. que pueden ser malteados pero la cebada es la que presenta menos inconvenientes. Varias razones hacen que este cereal sea el más adecuado para la elaboración de malta cervecera. Esto hizo que con el correr de los años se haya impuesto también entre los consumidores el sabor y el aroma de las cervezas elaboradas con malta de cebada. Los requerimientos que una malta cervecera debe cumplir son muy específicos. Color, nivel de proteínas, enzimas y la variedad de cebada utilizada, son los parámetros mas importantes. Existe una gran variedad de cebada que difieren en su aspecto y en su fisiología. El propósito del proyecto es lograr impulsar la economía de pequeños productores de cerveza y de cebada los cuales puedan ver esto como un empleo favorable y por ende impulsar la economía del estado de Michoacán para producir una cebada de calidad y competencia nacional. Para ello se utilizó cebada cultivada en la región de Michoacán y áreas circundantes, posteriormente se evaluó su viabilidad, bajo ciertos criterios de selección y con ello determinar la cebada ideal para el proceso de malteo el cual es acondicionado para que al desarrollar y obtener una malta de calidad. Se evaluará las características organolépticas por medio de pruebas panel sensoriales con panelistas inexpertos. Sobre este resultado de grado de aceptación se determinará la composición proximal y las características finales que como producto terminado debe reunir por normativa.

INTRODUCCIÓN

La industria cervecera en su rama artesanal ha ido en constante expansión en los últimos años lo que ha promovido mayor oportunidad de trabajo y desarrollo industrial en el estado, estas empresas consumen una gran cantidad de materias primas entre ellas las maltas y sobretodo *malta base* la cual se obtiene por medio de un proceso denominado malteo, el cual consiste en tomar granos de cebada de características optimas abarcando parámetros como capacidad germinativa, porcentaje de proteína y humedad esta se procesa para realizar transformaciones en el mismo grano para lograr la obtención de azúcares y enzimas las cuales serán utilizadas en el proceso de elaboración de cerveza la mata tiene que cumplir con una serie de parámetros con la finalidad de asegurar la calidad del producto final tales como poder diastásico, ensayo de beta glucanos, azúcares reductores, etc., actualmente estas empresas obtienen sus insumos comprándolos de marcas americanas u holandesas las cuales aumentan su precio debido a los gastos de envío y transporte, pocas empresas mexicanas consumen y/o producen malta y aún menos realizan un examen proximal con la finalidad de asegurar su calidad.

El proyecto se centra en el uso del grano de cebada producido en el estado de Michoacán o estados circundantes sometiéndolos a un proceso de malteo el cual servirá para obtener malta tipo base, este método se va modificando para ser viable en este tipo de cebada, finalmente la malta obtenida se le realiza análisis de acuerdo a las bases de comercialización de malteras americanas. Estas se basan en el grano *Hordeum distichon* el cual solo se bajó la demanda de estas comercializadoras, sin embargó seleccionando la cebada adecuada del tipo *Hordeum vulgare* puede producirse malta con características óptimas para la producción de cerveza.

Para ello se utiliza la cebada *Hordeum vulgare* proveniente de la región de La piedad, Michoacán. Ésta se somete al proceso de malteo el cual debe irse modificando a fin de ajustar el proceso para obtener malta de calidad, a la malta obtenida se le aplican las pruebas habituales que se le realizan a las maltas comerciales para el aseguramiento de su calidad. Adaptando el proceso este puede ser utilizado por los productores de cebada para empezar a producir malta para una industria en constante crecimiento como lo es la cerveza artesanal, esto fomentaría el desarrollo económico del estado debido a la comercialización de esta materia prima para las cerveceras debido a que este

insumo llega a ser muy caro en su compra a industrias americanas. Además, el proyecto comprende la fase de producción en la cual se encarga de producir malta y la fase analítica la cual genera el patrón de pruebas de análisis en maltas no solo para la producida en este proyecto sino para otras maltas también producidas localmente.

TEORÍA

Ajustar un método de malteo ya establecido para cebadas 2H *Hordeum distichon* y adaptarlo a cebadas 6H *Hordeum vulgare* producida en el estado de Michoacán específicamente en el área de la piedad. Este método se someterá a modificaciones en sus distintas fases con la finalidad de estandarizar el método y así obtener una malta de calidad a la cual se le adaptará un patrón de pruebas el cual servirá para verificar la calidad de la malta, estas pruebas se seleccionarán en base a la bibliografía y a los criterios necesarios para el control de calidad de la malta.

La malta es la cebada parcialmente germinada y secada; durante la germinación se producen una gran cantidad de enzimas activas que transforman las reservas del grano (principalmente almidón) en compuestos requeridos durante la elaboración de cerveza.

Actualmente, la cebada es el cereal más empleado para la elaboración de malta cervecera, en menor proporción se usa el trigo y sorgo. Cada año se producen alrededor de 1.5×10^7 toneladas de malta a partir de cebada; alrededor de un 94% de esa cantidad, es usada en la industria cervecera.

La malta es una materia prima necesaria para la fabricación de cerveza ya que confiere características de color, sabor y espuma por ello su elaboración exige controles rigurosos de tiempo y temperatura, el malteado constituye toda una industria que en la mayoría de los casos es independiente de la industria cervecera.

El objetivo del malteado es transformar las reservas nutritivas del grano a sustratos apropiados requeridos para la elaboración de cerveza mediante una germinación controlada; las siguientes características fisiológicas hacen de la cebada sea el cereal preferido para la elaboración de malta cervecera; cualidad que se dio a denotar a partir del siglo XVI

La planta de cebada pertenece a la familia de las Gramíneas, todas las cebadas se integran en el género *Hordeum* dentro del cual se encuentran las especies *Hordeum distichum* o dísticas (plantas que producen 2 granos en los nudos de la cabeza; es decir producen cabezas de 2 hileras) y *Hordeum vulgare* o hexísticas (son cebadas que producen cabezas de 6 hileras. Estas dos especies incluyen a numerosas variedades de cebada.

Ambas especies de cebada se emplean para la elaboración de malta cervecera; las variedades *H. distichum* producen granos más gruesos y uniformes, y por ello se utilizan para la elaboración de maltas primordialmente en países de Europa, en tanto que las variedades de *H. vulgare* poseen un alto potencial enzimático y son preferidas principalmente en cervecerías de México, Canadá y Estados Unidos

Este proyecto podría apoyar a los productores de cebada del estado para producir malta de un costo menor a la compra de importación aunado a la posibilidad de crear un patrón de pruebas de calidad en las maltas.

PARTE EXPERIMENTAL

Método de malteo.

Limpieza

Retirar harinas, ramas, raicillas o cualquier objeto extraño mediante cernidores

Lavar perfectamente el grano con agua purificada, retirar el grano y pasar al contenedor que servirá en la fase de remojo

Remojo.

Colocar el grano limpio en el contenedor y agregar agua y peróxido de hidrógeno al 30%. El proceso durará aproximadamente 2 días hasta que el grano alcance una humedad del 40%, realizar agitación en el contenedor por ciertos periodos.

Germinación.

La germinación será en camas las cuales deben de ser de un máximo de 1.5 cm de espesor, se removerá la cama cada 24 horas para evitar enredamiento de las raicillas, el germinado se detendrá cuando las raicillas del grano alcancen 3/4 de la longitud del grano.

En caso de ser necesario se rociará agua para mantener la humedad del grano, este proceso puede durar 4 días.

Secado.

El secado se realiza en 24 horas, comenzando con una temperatura de 55°-60°C aproximadamente unas 12 horas, hasta llegar a una humedad de 12%, posteriormente se incrementa la temperatura hasta llegar a tener un humedad final de 2-5%.

A la malta obtenida por este proceso se le realizan los siguientes parámetros:

1. Humedad
2. Extracto a 0.2 mm
3. Proteína total
4. Proteína soluble
5. Índice de kolbach
6. Viscosidad en el mosto
7. pH en el mosto
8. β - glucanos en el mosto
9. Sacarificación

Los parámetros de análisis, así como los valores obtenidos se obtuvieron comparando distintos tipos de marcas de malta, así como la bibliografía, esto se realizó ante la ausencia de una normativa específica para la malta, se presentan las pruebas más relevantes para el control de calidad en la elaboración de cerveza.

RESULTADOS

En el proceso del primer malteo hubo ciertos parámetros en los cuales se deben de hacer énfasis debido a cuidar los parámetros de humedad en el remojo y al finalizar el secado debido a que la humedad obtenida en el remojo resulto en 52% y la humedad al finalizar el secado termino en 8.8 estos parámetros deben ser cuidados para poder mantener el control del proceso.

En cuanto al análisis de calidad del producto terminado fue el siguiente.

Tabla 1. Resultados del Análisis Proximal de Malta *Hordeum vulgare* del Estado de Michoacán

PARÁMETRO	RESULTADO
Humedad	8.8%
Proteína total	9.74%
Proteína soluble	4,4%
Índice de kolbach	42.5%

Tabla 2. Resultados del Análisis Proximal de Malta Americana Marca *Boortmalt* cebada 2H

Parámetro	Valor
Humedad	4.3%
Extracto a 0.2 mm	84.3%
Proteína total	10.6%
Proteína soluble	4.5%
Índice de kolbach	43.4%
Viscosidad en el mosto	1.53 cP
pH en el mosto	5.95
Beta glucanos en mosto	155 ppm
Sacarificación	Menor a 15 -min

CONCLUSIONES

Los parámetros a cuidar en el proceso de malteo principalmente son la humedad, la germinación y el secado. A pesar de que esta prueba del malteo no ha reunido todas las características deseadas ya que se sigue trabajando en ello para su optimización, ha dado la pauta a que se puede realizar el

proceso en estos granos de cebada y que pueden llegar a obtener la calidad deseada para poder ser utilizada en la producción de cerveza y comercializarla.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ruiz Sánchez Y. (2006). "Elaboración y Evaluación de Maltas Cerveceras de Diferentes Variedades de Cebada (*Hordeum Vulgare*) Producidas en los Estados de Hidalgo y Tlaxcala". Pachuca De Soto, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
2. García Garibay, Quintero Ramírez, López Munguía.(2004) Biotecnología Alimentaria, México, Limusa P. 263 a 288
3. R. C. Hosney (1991) Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales, Acribia.
4. Nmx-Ff-043-Scfi-2003 Productos Alimenticios no Industrializados para Consumo Humanos-Cereal – Cebada Maltera (*Hordeum Vulgare L. Y Hordeum Distichum L.*)

EVALUACIÓN DEL USO COMPOSTA EN EL DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE ANTIOXIDANTES EN CULTIVO DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA*)

Laura Jeannette García Barrera¹, Joseph Israel Hernández Rivadeneyra¹, Job Jonathan Castro Ramos¹, Stefani Aletse Meza Zamora¹, Javier Ruiz Romero¹, Elibeth Anel González Martínez¹, Eduardo Gómez Sánchez² y Aida Solis Oba³

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, ²Universidad Politécnica de Guanajuato, ³Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

RESUMEN

Las compostas tienen diversos beneficios: se elaboran con residuos, por lo que es una manera ambientalmente amigable de disponer de ellos; son mejoradores de suelo, contienen micro y macro nutrientes para las plantas, mejoran el desarrollo y la calidad de los cultivos. En este trabajo se preparó una composta con estiércol de vaca y residuos vegetales provenientes del mercado y se aplicó al 5 y 10% en peso en cultivo de lechuga, las plantas se mantuvieron en invernadero durante dos meses. Cada semana se evaluó la altura de las plantas y contó el número de hojas; a los 60 días se evaluó el peso y contenido de antioxidantes mediante la cuantificación de DPPH, polifenoles y flavonoides totales. Como controles se utilizó suelo adicionado con urea (control positivo) y suelo sin ninguna adición (control negativo). Se encontró que a partir de la cuarta semana la altura y el número de hojas de las plantas adicionadas con composta fueron mayores al control negativo y desde la sexta semana también superaron a las del control positivo. Los pesos seco y fresco de las lechugas fueron mayores a ambos controles, las de mayor peso fueron adicionando la composta al 10%. Con el uso de la composta en ambas concentraciones se obtuvieron los mayores valores de DPPH, indicando que además las lechugas fueron más ricas nutrimentalmente hablando; con el análisis de DPPH se determina el contenido de antioxidantes en general; sin embargo adicionando urea incrementó la cantidad de polifenoles y flavonoides totales. La composta aportó los nutrientes importantes para el desarrollo de la planta de lechuga comparado con la aplicación de urea, por lo que las compostas son excelentes sustitutos de los productos químicos, mejorando el desarrollo y favoreciendo además que las hortalizas sean más ricas en contenido de antioxidantes.

INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las actividades más antiguas de la humanidad, ha sido fundamental para su supervivencia y desarrollo. El suelo es un elemento clave para el mantenimiento de la vida sobre la Tierra, su estructura es el factor principal que condiciona la fertilidad y productividad de los suelos agrícolas, su capacidad para soportar la vida vegetal y animal y moderar la calidad ambiental. Sin embargo, el suelo se encuentra bajo una creciente presión de deterioro derivada tanto del crecimiento poblacional, que demanda mayores cantidades de alimento, como de los patrones insostenibles de producción y consumo globales lo que causa, eventualmente, la degradación de la tierra. Someter el terreno a un intenso laboreo y compresión mecánica tiende a deteriorar la estructura del suelo, como formación de terrones, compactación, erosión, que puede resultar en una rápida pérdida de nutrientes, disminución de la disponibilidad de agua y aire para las raíces y supresión de procesos microbianos.

Por otro lado, los fertilizantes inorgánicos proveen nutrientes que están disponibles inmediatamente para las plantas, promoviendo el rápido crecimiento de la planta aumentando la producción del cultivo. Sin embargo, estos fertilizantes no mejoran la fortaleza del suelo ni reemplazan la materia orgánica que se pierde durante el cultivo, por lo que su uso continuo a largo plazo resulta en daño al suelo. La desertificación no es la transformación de diversos ecosistemas en desiertos, sino la pérdida, muchas veces irreparable, de las funciones productivas del suelo, la alteración de los ciclos biológicos y del ciclo hidrológico, así como la disminución del aporte y cantidad de servicios ambientales que generan los ecosistemas.

Comparado con los fertilizantes inorgánicos, los fertilizantes orgánicos tienen la ventaja de continuar mejorando el suelo después de que las plantas han tomado los nutrientes que necesitan. Se han realizado diversos estudios en los cuales se ha aplicado abono orgánico por largos períodos de tiempo, demostrando que su uso mejora la productividad y calidad del suelo, así como la calidad de

los productos agrícolas. Lo cual constituye una opción sostenible para mantener la calidad del suelo y para la recuperación de suelos degradados.

TEORÍA

Agricultura orgánica.

La agricultura orgánica es el sistema de producción que busca maximizar el uso de los recursos naturales, promoviendo la fertilidad del suelo, la actividad biológica del mismo y minimizando el uso de recursos no renovables. Los plaguicidas sintéticos, los fertilizantes minerales, los productos farmacéuticos, los organismos genéticamente modificados, los lodos residuales y la irradiación están prohibidos en todos los estándares orgánicos (FAO, 2014).

En todo el mundo, la producción de alimentos orgánicos ha ido en aumento, llegando a 37,2 millones de hectáreas en 2011. El valor total en ventas ese año fue de 63 mil millones de dólares. Desde 2002, la agricultura orgánica ha mantenido un crecimiento estable y considerable a pesar de la recesión económica mundial, y se considera que al menos el 1% de la tierra total cultivada en América Latina y el Caribe está dedicada a cultivos orgánicos (FAO, 2014).

Se ha demostrado que el uso de fertilizantes orgánicos, debido a su origen y composición, aumenta la productividad del suelo en varios tipos de cultivos, favoreciendo la mineralización y la capacidad de intercambio de cationes. Asimismo, favorece el restablecimiento de las características físico-químicas del suelo, al agregar materia orgánica mejora su contenido de carbono, sirviendo de reserva de nutrientes y micronutrientes, incrementa los niveles de nitrógeno presentes, la capacidad de retención de agua y se regula el pH.

La lechuga.

La lechuga es vegetal popular para su consumo como ensalada y representa una buena fuente de minerales, además de su contenido de compuestos fenólicos, ácido ascórbico, vitaminas A y K y antioxidantes. Los antioxidantes naturales son metabolitos secundarios de plantas como los carotenoides, flavonoides, ácido fólico, ácido ascórbico, tocoferoles, etc. (Ghasemzadeh, 2010). Tiene un alto contenido de agua, vitaminas, minerales y fibra que favorece y facilita el peristaltismo. Según el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes, es una muy buena fuente de vitamina A, C, ácido fólico y potasio, por lo que es una fuente importante de estos nutrientes en la dieta mexicana por su composición nutricional y de fácil acceso.

En promedio, se estima que la cantidad de nutrientes requeridos por hectárea de lechuga es: 50 kg/ha de nitrógeno, 25 kg/ha de fósforo, 130 kg/ha de potasio (Casaca et al., 2005), 35 kg/ha de Calcio y 10 kg/ha de Magnesio.

Composta

El compostaje es un proceso metabólico realizado por diferentes microorganismos, que en presencia de oxígeno, aprovechan el nitrógeno (N) y el carbono (C) presentes para producir biomasa, calor y un sustrato sólido, con menos C y N, pero más estable, llamado compost o composta. El compostaje es una práctica ampliamente aceptada como sostenible y utilizada en todos los sistemas asociados con la agricultura orgánica; combina la protección del medio ambiente con la producción agrícola sostenible. El compostaje brinda la posibilidad de transformar los residuos orgánicos de manera segura en insumos para la producción agrícola. La FAO define como composta la mezcla de materia orgánica en descomposición, en condiciones aeróbicas, que se utiliza para mejorar la estructura del suelo y proporcionar nutrientes (Román, 2013).

La composta tiene la capacidad de restaurar los nutrientes perdidos por la erosión del suelo, restablece los niveles adecuados de pH, conductividad, densidad y textura del suelo, promueve la retención de humedad e incorpora nutrientes y micronutrientes en el suelo, que permanecen disponibles por más tiempo, ya que evita lixiviarlos (FAO, 2014).

Antioxidantes

Los antioxidantes son importantes porque captan los radicales libres, éstos se producen inevitablemente en sistemas biológicos, y se sabe que causan diversos trastornos degenerativos, como la mutagénesis, la carcinogénesis, las alteraciones cardiovasculares y el envejecimiento (Singh y Singh, 2008). Los antioxidantes son los compuestos que captan los radicales libres interviniendo en cualquiera de los tres pasos principales del proceso oxidativo mediado por radicales libres: iniciación, propagación y terminación (Cui et al., 2004). Estos antioxidantes son producidos

por el sistema biológico y ocurren naturalmente en muchos alimentos, y el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes determina la salud y el vigor (Halliwell, 1996).

Los compuestos antioxidantes de fuentes dietéticas están recibiendo una mayor atención, entre ellos se encuentran los flavonoides, el grupo ampliamente distribuido de metabolitos secundarios en el reino vegetal. Los flavonoides son elementos inseparables de la dieta humana, exhiben diferentes actividades biológicas que influyen en numerosas vías metabólicas. Debido a sus actividades de eliminación de radicales, antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, anticancerígenas, antiateroscleróticas, antiagregantes y de desintoxicación, podrían ser útiles para la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades humanas (Majewska, 2011).

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y generalmente están involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por parte de los patógenos. En la última década, ha habido mucho interés en los beneficios potenciales para la salud, que ofrecen los polifenoles de las plantas comestibles. Diversos estudios sugieren que el consumo a largo plazo de dietas ricas en polifenoles vegetales ofrece protección contra el desarrollo de cánceres, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas. Los polifenoles son compuestos naturales que se encuentran principalmente en las frutas, verduras, cereales y bebidas (Pandey, 2009).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

El suelo se obtuvo de una parcela agrícola ubicada en Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México, en las coordenadas 19° 15' 59" Norte, 98° 22' 38" Oeste. Se colectaron 250 kg de suelo de 3 excavaciones de 1mx1mx0.5m. El suelo se cribó en malla de 0.5x0.5mm y se secó a la sombra para eliminar la humedad.

Los residuos que se utilizaron para preparar la composta fueron:

- a) residuos vegetales del mercado local de San Martín Texmelucan, Puebla, consistentes en lechuga, hojas de coliflor y nopal, principalmente.
- b) estiércol de vaca de una granja en Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala
- c) rastrojo de maíz también de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala.

Preparación de la composta

La composta se preparó en pila, su composición fue de 82% estiércol de vaca, 14% residuos de vegetales y 4% rastrojo de maíz. La pila se aireó mecánicamente y humedeció cada semana durante seis meses; al término de este tiempo se midió el pH, conductividad eléctrica, contenido de N, P y K, así como el índice de germinación y contenido de materia orgánica. Las mediciones que se hicieron a la composta y suelo fueron de acuerdo con los métodos de la norma Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

Cultivo de lechuga

Para el cultivo de lechuga se mezcló la composta con el suelo agrícola, considerando el 5 y 10% en peso; se llenaron bolsas negras con 2 kg de la mezcla de suelo y composta y se colocó una plántula de lechuga de 15 días de crecida, se utilizaron 15 plantas por tratamiento. El control positivo fue utilizando dos aplicaciones de urea (250 kg/ha), a los 15 y 30 días del trasplante; el control negativo fue utilizando suelo sin la adición de ningún fertilizante. Las plantas se regaron cada tercer día, se mantuvieron en invernadero durante dos meses. Semanalmente se midió la altura de las plantas y se contó el número de hojas. A los 60 días se extrajeron las plantas, se separó la raíz de la parte aérea y se pesó la parte aérea en fresco.

Medición de antioxidantes

El contenido de antioxidantes en las hojas de lechuga se evaluó a los 45 y 60 días, primeramente se molió un gramo de hojas fresca con 20 ml de metanol, se centrifugó y el sobrenadante se empleó para las determinaciones:

Prueba del DPPH se hizo de acuerdo con Ojha et al. (2012), la medición de polifenoles totales fue de acuerdo con García et al. (2015) y el contenido de flavonoides según lo descrito por Liu et al (2011).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los parámetros medidos al suelo y a la composta y se compararon con la norma NADP-020-AMBT-2011. Se observa que el suelo es pobre en nutrientes. La composta tuvo un pH básico y ligeramente bajo contenido de materia orgánica así como de macronutrientes.

Tabla 1. Parámetros medidos al suelo y a la composta

Parámetros	Suelo	Composta	Norma NADP-020-AMBT-2011
pH	8.2	9.3±0.2	6.5-8
EC (dS/m)	0.3	3.8±0.06	<8
Indice de germinación (%)		103.4±1.5	≥75%
Carbono orgánico (%)	0.5	18.0±0.64	>20%
N (%)	0.01	1.4±0.008	1-3% de cada uno, suma <7%
K (%)	0.11	0.57±0.01	
P (%)	0.16	0.6±0.004	

La figura 1 muestra las alturas medidas a las plantas de lechuga desde la semana 3 hasta la 8, se observa que adicionado 5 o 10% de composta, se obtuvo mayor altura en las plantas comparado con el uso de la urea y en el control suelo. Lo cual indica que la composta es un buen sustituto de los fertilizantes químicos.

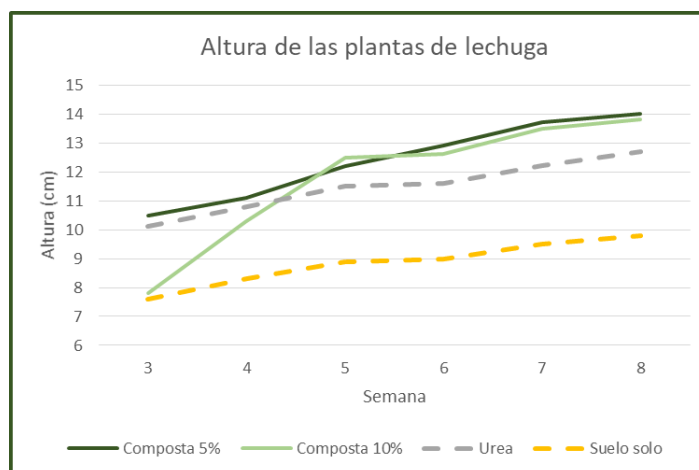


Figura 1. Altura de las plantas de lechuga medida semanalmente

La figura 2 muestra el número de hojas contabilizado semanalmente, en este caso se observa que el número promedio de hojas de las plantas donde se usó composta fue estadísticamente igual que las plantas donde se utilizó urea; pero mayores a las plantas crecidas en el suelo sin ninguna adición de nutrientes.

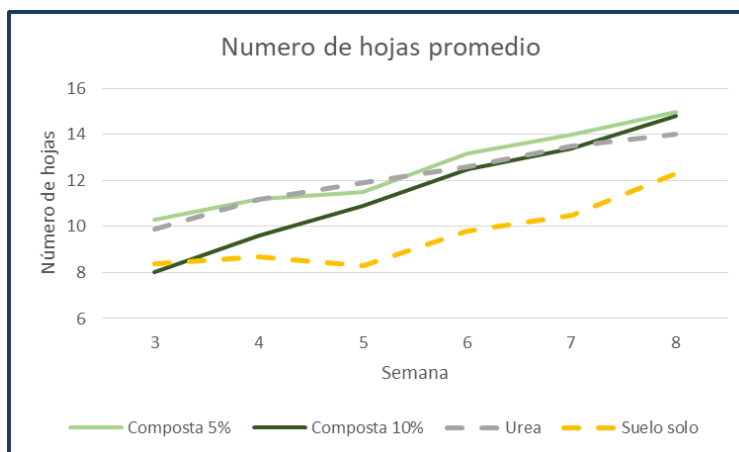


Figura 2. Número de hojas promedio de las plantas de lechuga

La tabla 2 muestra los datos del peso fresco promedio del follaje y la cuantificación de antioxidantes obtenida mediante al ensayo de DPPH, cuantificación de polifenoles y flavonoides. En todos los casos los antioxidantes estuvieron en mayor cantidad que en el control suelo. Con DPPH se muestra que adicionando composta también se incrementó el contenido de antioxidantes comparado con el uso de urea, esta prueba no específica, sólo indica que estas plantas tienen más antioxidantes pero no se sabe de qué tipo. Mientras que las plantas donde se aplicó urea tuvieron mayores polifenoles y flavonoides que usando las compostas.

Tabla 2. Contenido de antioxidantes promedio de las lechugas

	Peso fresco (g)	DPPH inhibición (%)	Polifenoles (mg GAE/g PF)	Flavonoides (mg RE/g PF)
Composta 5%	8.69	57.5	1.49	4.72
Composta 10%	11.36	61	1.68	3.95
Urea	3.378	53	1.99	5.68
Suelo solo	1.97	44.6	1.38	3.44

Este efecto también ha sido reportado por otros autores, por ejemplo un estudio de Magkos et al (2003) mostró que en el caso de varios vegetales cultivados orgánicamente fueron de mayor tamaño comparados con aquellos cultivados de manera convencional. Kapoulas et al (2017), encontraron que la lechuga producida orgánicamente tuvo mayor desarrollo que usando sistemas convencionales. Otros estudios con lechuga reportan que la fertilización inorgánica resulta en menor rendimiento que usando estiércoles (Masqueda et al, 2011), lo cual lo explican por la diferencia en la biodisponibilidad de los nutrientes, la tolerancia al estrés salino y actividad microbiana. El rendimiento es afectado por varios factores, incluyendo las condiciones climatológicas, resistencia o tolerancia al estrés biótico y abiótico de la variedad que se cultive, al sistema de cultivo y tipo de fertilización usado (Kapoulas, et al 20017).

CONCLUSIONES

El uso de compostas es una excelente alternativa para sustituir el uso de productos químicos, ya que aplicadas en pequeñas cantidades, como es el 5 y 10%, mejoran el desarrollo de las plantas, obteniéndose plantas con mayor altura y su contenido de antioxidantes también se incrementa.

BIBLIOGRAFÍA

1. D. Casaca, "El cultivo de lechuga", Guías tecnológicas de frutas y vegetales, Banco interamericano de desarrollo Documento técnico, 2005, pp. 11

2. K. Cui, X. Luo, K. Xu, M. Ven, "Review Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants", *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, Vol. 28, 5, 2004, pp. 771-799.
3. FAO. "Capítulo 1. Conceptos y temas generales de la agricultura orgánica". <http://www.fao.org/docrep/005/y4137s/y4137s03.htm>
4. A. Ghasemzadeh, Z. Hawa, R. Asmah, "Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)", *Molecules*, 15, 2010, pp. 4324-4333.
5. B. Halliwell, "Review Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans", *Free Radic. Res.*, Vol. 25, 1, 1996, pp. 57-74.
6. N. Kapoulas, A. Koukounaras, Z. Illic, "Nutritional quality of lettuce and onions as companion plants from organic and conventional production in north Greece". *Scie. Horticulturae*, 219, 2017, pp. 310-318.
7. F. Magkos, F. Arvaniti, A. Zampelas, "Organic food: nutritious food or food for thought, a review of evidence", *Int. J. Food Sci. Nutr.*, Vol. 54, 2003, pp. 357-371.
8. M. Majewska, M. Skrzycki, M. Podsiad, H. Czczot, "Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: an in vitro study", *Acta Poloniae Pharmaceu. Drug Res.*, Vol. 68, 4, 2011, pp. 611-615.
9. C. Maqueda, J. Herencia, J. Ruiz, M. Hidalgo, "Organic and inorganic fertilization effects on DTPA-extractable Fe, Cu, Mn and Zn and their concentration in the edible portion of crops", *J. Agric. Sci.*, Vol.149, 2011, pp. 461-472.
10. NADF-020-AMBT-2011, "Norma ambiental para el Distrito Federal NADF-020-AMBT-2011", *Gaceta Oficial del Distrito Federal*. 2012, México.
11. K. Pandey, S. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease", *Oxid. Med. Cell. Longev.*, Vol. 2, 2009, pp. 270-278.
12. P. Román, M. Martínez, A. Pantoja, "Manual de compostaje para el agricultor. Experiencias en América Latina", Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Chile, 2013.
13. S. Singh, R. Singh, "In vitro methods of assay of antioxidants: An overview", *Food Rev. Int.* Vol. 24, 4, 2008, pp. 392-415.

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE VERDOLAGA (*PORTULACA OLERACEA* L.) EN FASE VEGETATIVA A ESTRÉS POR NaCl

Guevara O., B. K.¹; Trejo T., L.I.¹; Gómez M., F.C.¹; Ruíz P., L.M.¹;
García M., S.²; Escalante E., J.A.¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México –Texcoco.56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

²CONACYT-CIATEJ Plant Biotechnology. Camino Arenero 1227. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México.

RESUMEN

Se ha determinado que en glicófitas, la salinidad ocasiona supresión del crecimiento y bajo potencial osmótico. Sin embargo, la verdolaga (*Portulaca oleracea*), es una especie que ha mostrado resistencia a la salinidad adaptándose al estrés y mejorando su respuesta fisiológica y morfológica. Por lo anterior, en esta investigación se estimaron los efectos de cinco niveles de salinidad ocasionada por NaCl (0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 M), en la respuesta fisiológica de esta especie. Se tomaron plantas con 42 días de desarrollo las cuales fueron trasplantadas y regadas con solución de Hoagland, a la cual se adicionaron los niveles de NaCl. Se condujo un experimento completamente al azar donde cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Después de 14 días de tratamiento, se determinaron las lecturas SPAD y la transpiración. Con los resultados obtenidos se realizó análisis de varianza y pruebas de comparación de medias usando el software SAS. Tanto las unidades SPAD como la transpiración no fueron afectadas de manera importante por la salinidad; mostrando la tolerancia que tiene esta especie a concentraciones altas de salinidad inducida por NaCl.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento vegetal es el resultado de la combinación de numerosos procesos metabólicos y fisiológicos; a su vez, los procesos fisiológicos son afectados por diferentes factores ambientales que determinan respuestas ante factores de estrés en la planta (Kumar y Bandhu, 2005). Dado que dichas respuestas están condicionadas de individuo a individuo y son reguladas por genes particulares que desencadenan reacciones en cascada, el efecto del estrés ambiental como la salinidad, es un fenómeno complejo que no solo involucra al desajuste osmótico sino el efecto tóxico de iones y el desbalance nutrimental (Ashraf, 2004). De esta manera para facilitar el estudio de los factores intrínsecamente relacionados con la influencia de la salinidad en la fotosíntesis y regulación osmótica, es necesario separar el estudio en sus diferentes componentes.

La especie *Portulaca oleracea* (verdolaga) es un quelite de la familia Portulacaceae arvense y ruderal, de porte corto, de crecimiento anual, suculenta y tallo postrado aunque existen accesiones de tallo erecto. Tiene hojas alternas carnosas obovadas-cuneadas a espatuladas (Vibrans, 2009). Tiene la capacidad de alternar su metabolismo fotosintético de C4 a CAM (Lara *et al.*, 2004). Aunque no todas las accesiones de verdolaga son resistentes a la salinidad, existen variedades cuyo proteoma es capaz de adaptarse a las condiciones del medio (Murly *et al.*, 2015). A pesar de las investigaciones realizadas en verdolaga relacionadas con sus respuestas al estrés salino y su influencia en la nutrición (Teixeira y Carvahlo, 2009), la producción de osmoprotectantes (Rahdari *et al.*, 2012) y su efecto en la biomasa y respuesta fisiológica (Alam *et al.*, 2015), ninguno estudio ha sido seguido fenológicamente; es decir, durante el desarrollo completo de la planta. La mayoría de los estudios realizados se enfocan en fases tempranas de desarrollo.

En el contexto anterior, este estudio tuvo como objetivo el análisis de la respuesta fisiológica de verdolaga al estrés salino en fase vegetativa madura para evaluar sus componentes.

PARTE EXPERIMENTAL

Esta investigación se condujo bajo condiciones de invernadero en Montecillo, Estado de México. Se emplearon plantas de verdolaga (*Portulaca oleracea*), de 42 d de edad, en fase vegetativa madura. Se evaluaron cinco tratamientos consistentes en distintos niveles de salinidad inducida por NaCl (0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 M), que fueron suministrados a la solución nutritiva de Hoagland (Kafi y Rahimi, 2011) con la que fueron regadas durante 14 d las plantas de verdolaga.

Se condujo un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue un contenedor de unicel de 250 mL de capacidad con una planta de verdolaga, empleando perlita como sustrato. Los volúmenes de solución regados por unidad experimental fueron 150 mL.

Las variables evaluadas fueron transpiración que se midió con un Porómetro marca Li-Cor modelo LI-1600y lecturas SPAD, medidas con un medidor de clorofila marca Minolta modelo SPAD 502 plus. Las variables fueron tomadas sobre la superficie de la décima hoja por debajo de la zona apical ya que son las de mayor tamaño

Con los resultados obtenidos se realizó análisis de varianza y pruebas de comparación de medias usando el software SAS (SAS, 2011).

RESULTADOS

Las lecturas SPAD representan una evaluación cuantitativa de la intensidad del color verde de las hojas. Mide trasmisiones de luz a 650 nm, donde ocurre la absorción de luz por parte de las moléculas de clorofila y a 940 nm donde no hay absorción (Argenta *et al.*, 2001).

Las unidades SPAD solo fueron estadísticamente distintas entre dos tratamientos, 0.25 y 1 M NaCl como se observa en la Figura 1. Las lecturas SPAD son un indicador indirecto del estatus del pigmento fotosintético más importante, la clorofila (Guimarães *et al.*, 1999). Contrario a los resultados aquí obtenidos, en trigo, las unidades SPAD se vieron profundamente afectadas por la salinidad (Shah *et al.*, 2017).

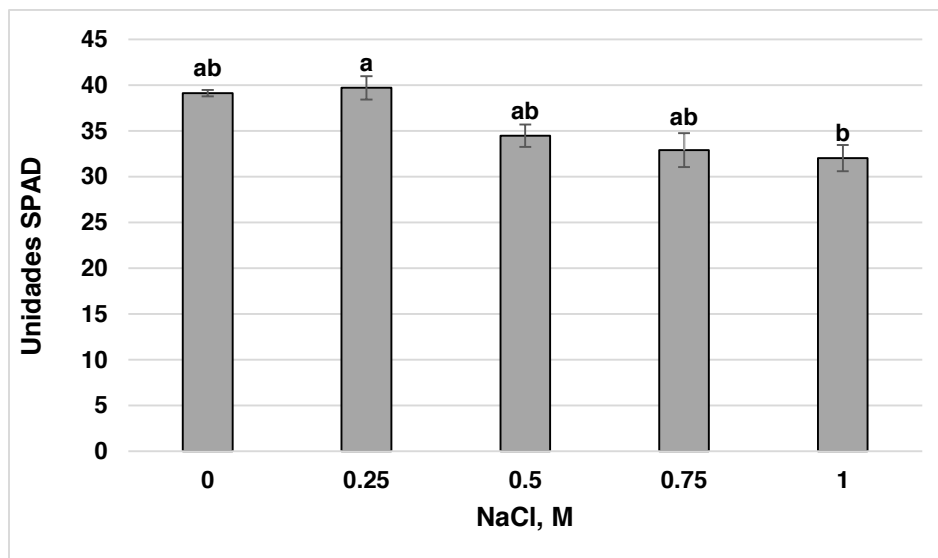


Figura 1. Unidades SPAD en hojas de plantas de verdolaga en fase vegetativa madura, después del tratamiento durante 14 d con diferentes niveles de salinidad inducida por NaCl. Medias \pm DE con letras distintas, indican diferencias estadísticas (Tukey, 0.05).

Se describe como uno de los efectos del estrés salino la reducción del crecimiento, asimismo se ha mostrado que dicha reducción es causada por un decremento en la transpiración resultado del aumento del efecto osmótico (Shalhevet, 1994). Esta situación no fue observada en este estudio; donde se observa que los niveles de NaCl estudiados no afectaron la tasa transpiratoria (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tasa transpiratoria (E) de plantas de verdolaga en fase vegetativa madura, después del tratamiento durante 14 d con diferentes niveles de salinidad inducida por NaCl.

NaCl (M)	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)
0.00	1.861 ± 0.486 a
0.25	2.058 ± 1.091 a
0.50	2.334 ± 0.286 a
0.75	2.201 ± 0.056 a
1.00	1.604 ± 0.352 a

Medias ± DE con letras iguales, indican que no existen diferencias significativas Tukey, 0.05).

CONCLUSIONES

El aumento en la concentración iónica no tuvo efectos importantes en las unidades SPAD y en la tasa transpiratoria en verdolaga. Estos resultados muestran la tolerancia que esta especie tiene a altos niveles de salinidad inducida por NaCl.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Alam, J. A. Shukor, M. Y Rafii, H. A. Abdul, "Effect of Salinity on Biomass Yield and Physiological and Stem-Root Anatomical Characteristics of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) Accessions", *BioMed Research International*, 2015, pp. 1-15.
2. G. Argenta, P. R. F. Silva, E. L. Fosthofer, M. L. Strieder, E. Suhre, L. L. Teichmann, "Parâmetros de planta como indicadores do nível de nitrogênio na cultura do milho", *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Vol. 37, 4, 2002, pp. 519-527.
3. H. Vibrans. 29 de agosto de 2009. Malezas de México. *Portulaca oleracea*. 13 de abril de 2018. (en línea).
4. J. Shalveret, "Using water of marginal quality for crop production: major issues", *Agric. Water Manage.*, Vol. 25, 1994, pp. 233-269.
5. K. R. Murly, B. A. Hanson, D. A. Dudle. "Alternative Strategies in Response to Saline Stress in Two Varieties of *Portulaca oleracea* (Purslane)", *Plos One*, 2015, pp. 1-18.
6. M. Ashraf, "Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants", *Flora* Vol. 199, 2004, pp. 361-376.
7. M. Kafi, Z. Rahimi, "Effect of salinity and silicon on root characteristics, growth, water status, proline content and ion accumulation of purslane (*Portulaca oleracea* L.)", *Soil Science and Plant Nutrition*, Vol. 57, 2011, pp 341-347.
8. M. V. Lara, M. F. Drincovich, S. C. Andreo, "Induction of a Crassulacean Acid-like Metabolism in the C4 Succulent Plant, *Portulaca oleracea* L.: Study of Enzymes Involved in Carbon Fixation and Carbohydrate Metabolism", *Plant Cell Physiol.*, Vol 4, 5, 2004. pp. 618-626.
9. M. Teixeira, I. S. Carvalho, "Effects of salt stress on purslane (*Portulaca oleracea*) nutrition", *Ann Appl Biol.*, Vol. 154, 2009, pp.77-86.
10. P. A. Kumar, A. D. Bandhu, "Salt tolerance and salinity effects on plants: a review", *Eco. Envir. Saf.*, Vol. 60, 2005, pp. 324-349.
11. P. Rahdari, S. Tavakoli, S. H. Meysam, "Studying of Salinity Stress Effect on Germination, Proline, Sugar, Protein, Lipid and Chlorophyll Content in Purslane (*Portulaca oleracea* L.) Leaves" *J. Stress Physiol. Biochem.*, Vol 8, 1, 2015, pp.182-193.
12. S. H. Shah, R. Houborg, M. F. McCabe, "Response of chlorophyll, carotenoid and SPAD-502 measurement to salinity and nutrient stress in wheat (*Triticum aestivum* L.)", *Agronomy*, Vol. 7, 61, 2017, pp. 1-21.
13. SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
14. T. G. Guimarães, P. C. R. Fontes, P. R. G. Pereira, V. V. H. Alvarez, P. H. Monnerat, "Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo", *Bragantia*, Vol. 58, 1, 1999, pp. 209-216.

CORRELACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA PREDOMINANTE CON EL TIPO DE EMPAQUE DE SALCHICHAS DETERIORADAS RECUPERADAS DE EXPENDIOS Y MERCADOS NACIONALES

Tania Karina Ceja Farias, Rosa Ma. Contreras Macias, Andrea González Arámbula, Claudia Luz Navarro Villarruel, María Guadalupe Ávila Novoa, Melesio Gutiérrez Lomeli y J. Jesús Padilla Frausto

Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Ciénega. taniaceja@gmail.com

RESUMEN

La salchicha es el producto cárnico procesado de mayor producción y consumo en México, según datos del Consejo Nacional de la Carne en su informe anual 2017. PROFECO reportó que en nuestro país se encuentran en el mercado 26 marcas diferentes de salchichas, producidas por ocho plantas industriales. En la región centro occidente del país se pueden encontrar a 20 de esas marcas. En este estudio se recolectaron 100 productos, cinco de cada marca, de lotes de producción distintos, durante el periodo de marzo a junio del 2017. Se caracterizó y registró el tipo de empaque, número de unidades por empaque, cantidad de alimento, lote y fecha de caducidad. Se observó y caracterizó el tipo de deterioro, se evaluó una muestra del alimento con el objetivo de aislar la población microbiana predominante. Los géneros y especies de las bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de las muestras fueron determinados mediante el sistema de galerías bioquímicas API50 CHL. Se determinó la correlación de la población microbiana predominante y el tipo de deterioro, con el tipo de empaque de las salchichas deterioradas esto mediante una correlación de McNemar. Se logró identificar una correlación entre la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y empaques simples, flexibles, herméticos pero no al vacío ($p < 0.05$) que resulta ser lógico dado que se trata de un microorganismo aerobio. En los empaques al vacío la flora predominante estuvo constituida por BAL ($p < 0.05$) del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*, independientemente del número de unidades contenidas en el empaque ($p > 0.05$) y la cantidad de alimento ($p < 0.05$). Así mismo, se encontró una relación entre la población microbiana encontrada en las marcas producidas por la misma planta industrial ($p < 0.05$), e incluso entre plantas de la misma empresa ($p < 0.05$).

INTRODUCCIÓN

La salchicha es el producto cárnico procesado de mayor producción y consumo en México, según datos del Consejo Nacional de la Carne en su informe anual 2017 (4). El consumo per cápita anual en México es de 3.91 kg de salchicha, siendo la salchicha Viena la que principalmente se consume en el país (10). De 2005 a 2016 la producción de salchicha en México (figura 1), presentó un aumento de 4.5% anual de 345'000 toneladas a 516'000 toneladas, respectivamente y un valor de \$5 408 mdp a \$13 678 mdp, respectivamente (4). Las salchichas no son estériles, esto influye notablemente en el deterioro prematuro del producto durante su transporte y comercialización, es decir previo a la fecha de vencimiento, esto sucede a pesar de la adición de agentes activos en su formulación (sal y nitritos), el uso de temperaturas de refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) y el tratamiento térmico para horneado o cocción ($\geq 70^\circ\text{C}$), como factores de conservación, cuyo objetivo es limitar el desarrollo microbiano (6). Sin embargo, la contaminación postratamiento de cocción por el ambiente, equipo o personal, puede introducir una amplia variedad de microorganismos, además algunos métodos de conservación usados en embutidos cocidos u horneados empacados para su comercialización, favorecen al desarrollo de BMA, por otro lado, el empacado al vacío favorece el desarrollo de bacterias ácido lácticas (BAL) psicrótrofas, debido a su característica de desarrollo en anaerobiosis. Tales grupos predominan en este tipo de productos y son directamente los responsables de su deterioro (5, 6, 9). Además debemos sumar el alto riesgo de deterioro al que se expone el embutido si durante su comercialización se llevan a cabo malas prácticas de manipulación como el abuso de temperatura durante el transporte y almacenamiento en expendios, o el retraso del consumidor en regresarlo a temperatura de refrigeración durante su traslado a casa.

Volumen y Valor de la producción de salchichas tendencia 2005-2016

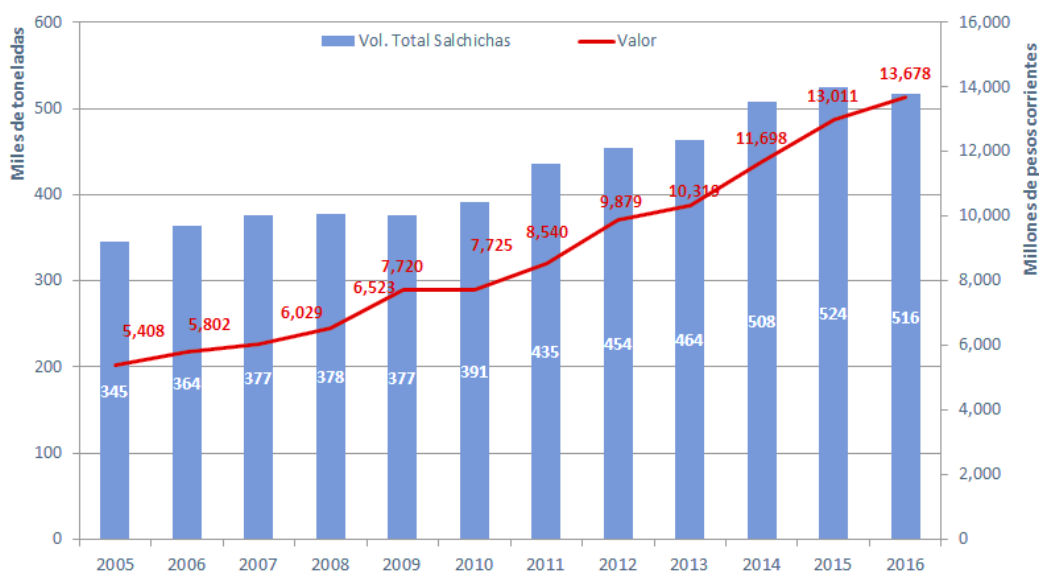


Figura 1. Volumen y valor de la producción de salchichas en México tendencia 2005-2016. Fuente: COMECARNE, 2017.

De acuerdo a varios estudios realizados en materia de este tema, los principales signos de deterioro que se presentan en las salchichas empacadas al vacío son: la formación de limo en la superficie del producto, acumulación de exudado, producción de gas (pérdida de vacío), cambio de color, formación de colonias sobre la superficie del producto y acidificación del mismo (2, 3, 6, 9, 13).

La combinación de los factores antes mencionados dará como resultado la disminución de la calidad del producto. En este contexto, los alimentos deteriorados generalmente se consideran no aptos para el consumo, por lo que cualquier producto deteriorado antes de la fecha de vencimiento representa forzosamente una pérdida económica para las empresas que elaboran este tipo de productos cárnicos empacados al vacío.

Por esta razón, es la industria alimenticia quien atiende, mayormente por interés económico, las necesidades de mejorar la calidad y estabilidad de su producto.

METODOLOGÍA

Obtención de la muestra.

Recolección de empaques (no deteriorados) de diferentes productos disponibles para su venta en México: Se identificaron las marcas comerciales de salchicha disponibles para su venta en México, de las cuales se seleccionaron 20 marcas (las de mayor distribución de puntos de venta en cadenas comerciales). Se obtuvieron 5 empaques por marca comercial de cinco diferentes lotes de producción (incluyendo a las marcas de la empresa que solicitó el estudio). Los empaques de salchicha seleccionados se trasladaron al laboratorio para promover su deterioro.

Aislamiento de BAL.

Tras observar un deterioro evidente en el producto empacado, (considerando la presencia de limo, gasificación, cambio de color del producto y/o desarrollo evidente de colonias –peças blanquecinas–), se obtuvo una muestra homogénea del producto. La muestra consistió en la recolección de 1 mL de limo y en el caso de que este no existiera, se le adicionaron 5 mL de solución salina fisiológica estéril, se homogeneizó durante 2 min (mediante frotado manual) y se obtuvo 1 mL de la solución homogeneizada. La alícuota de limo o solución homogeneizada, fueron cultivadas en agar MRS (Difco®), mediante la técnica de vaciado en placa, se incubó a 30 °C durante 48 h en condiciones

de anaerobiosis, empleando empaques Gas-Pak® (BD®). La selección de las colonias de BAL sospechosas, se realizó mediante muestreo aleatorio y representativo. Las colonias catalasa negativa, se sembraron para obtención de biomasa en agar MRS (Difco®) incubándose a 30 °C durante 48 h a condición de anaerobiosis.

Caracterización bioquímica de las BAL en el producto.

Se determinó el género y especie de las cepas de BAL, empleando la galería API 50 CHL que es un sistema comercial estandarizado, que asocia 50 pruebas bioquímicas para el estudio del metabolismo de los carbohidratos de los microorganismos. El API 50 CHL, se utiliza para la identificación de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y géneros relacionados. El sistema consta de una plataforma digital que facilita la asociación de pruebas bioquímicas (API web system®).

Análisis estadístico de los datos.

Se determinó la correlación de la población microbiana predominante y el tipo de deterioro, con el tipo de empaque de las salchichas deterioradas esto mediante una correlación de McNemar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró identificar una correlación entre la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y empaques simples, flexibles, herméticos pero no al vacío ($p < 0.05$) que resulta ser lógico dado que se trata de un microorganismo aerobio. Diversos estudios han reportado el control del deterioro de la salchicha por este microorganismo mediante el empleo de atmosferas modificadas y empaque al vacío (8, 13). En los empaques al vacío la flora predominante estuvo constituida por BAL ($p < 0.05$) del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*, independientemente del número de unidades contenidas en el empaque ($p > 0.05$) y la cantidad de alimento ($p < 0.05$). Narasimha y Sachindra, (2002) declararon que las BAL son la población principal causante del deterioro en productos empacados al vacío. En este estudio se sugería que al incrementar el número de unidades en un empaque al vacío, tanto la pasteurización, como el efecto del empaque, mermaría su efecto de reducción de la población microbiana, lo que logro confirmarse, es decir, empaques de menos unidades logran mantenerse más estables en almacenamiento, aun con cargas considerables de BAL, principal factor para el deterioro de la salchicha (1).

Así mismo, se encontró una relación entre la población microbiana encontrada en las marcas producidas por la misma planta industrial ($p < 0.05$), e incluso entre plantas de la misma empresa ($p < 0.05$). Møretro, y Langsrud (2017), reportan que las superficies de contacto de los alimentos en las líneas de producción de alimentos, pueden fungir como reservorios de microorganismos que contaminan continua o discontinuamente al alimento. Particularmente, Padilla-Frausto, y col., (2015) reportaron la presencia de *Leuconostoc* spp. en diferentes superficies de contacto, que aportan cargas considerable a la salchicha posterior a su horneado y previo a su empaque. En este contexto, explicable que en las plantas de producción de salchicha que se consideraron en este estudio, coincidiera la población microbiana encontrada.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio, son de utilidad para dibujar el escenario del deterioro microbiano de la salchicha que actualmente se expenden en mercados nacionales. Así mismo, evidencia una posible persistencia por residencia de microorganismos en superficies de contacto con el alimento, en las líneas de producción de la salchicha. De igual manera, se sugiere emplear un sistema de barreras múltiples, que permita controlar el deterioro microbiano de la salchicha, independientemente de la carga de BAL con que se cuente al final de su producción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Borch, E., Kant-Muermans, M. L., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International journal of food microbiology*, 33(1), 103-120.
2. Buelvas-Salgado, J. H. Patiño-Gómez y C. E. Restrepo-Flores, "Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío", *Rev. Lasallista Investig.*, Vol. 9, 2013, pp. 55-64.

3. Cepeda-Márquez, L.G. "Detección de fuentes de contaminación e inactivación de *Leuconostoc mesenteroides* en salchicha Viena en una planta procesadora" Tesis. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. PROPAC-Universidad Autónoma de Querétaro. 2009.
4. Consejo Mexicano de la Carne, "Compendio estadístico 2016 de la industria cárnica mexicana", 2017, Disponible en la página :
<http://infocarne.comecarne.org/compendio/visualizar?comp=9&componente=487>
Fecha de acceso: Julio de 2017.
5. De Martinis, E. C., M. R. Públio, P. R. Santarosa y F. Z. Freitas, "Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products" *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 32, 1, 2001, pp. 32-37.
6. Gallardo, C. , R. García-García y J. Welti-Chanes, "Innovación en el desarrollo y mejora de productos cárnicos a través del uso de altas presiones hidrostáticas", *Nacameh*, Vol. 9, 2015, pp. 19-53.
7. Møretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022-1041.
8. Narasimha Rao, D., & Sachindra, N. M. (2002). Modified atmosphere and vacuum packaging of meat and poultry products. *Food Reviews International*, 18(4), 263-293.
9. Ossa, J., A. Coral y M. Vanegas, "Microbiota de jamones de cerdo cocidos asociada al deterioro por abombamiento del empaque", *Rev. MVZ Córdoba* Vol. 15, 2010, pp. 2078-2086.
10. PROFECO, Procuraduría Federal del Consumidor, "Salchichas, Carne y ¿qué más?", *Revista del consumidor*, Vol. septiembre 2014. 2014, pp. 55-67. Disponible en la página: https://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_07/38-47%20LAB%20SALCHICHASOKMM.pdf
Fecha de acceso: Julio de 2017.
11. Padilla-Frausto, J. J., Cepeda-Marquez, L. G., Salgado, L. M., Iturriaga, M. H., & Arvizu-Medrano, S. M. (2015). Detection and genotyping of *Leuconostoc* spp. in a sausage processing plant. *Journal of food protection*, 78(12), 2170-2176.
12. Tremonte, P., Sorrentino, E., Succi, M., Reale, A., Maiorano, G., & Coppola, R. (2005). Shelf life of fresh sausages stored under modified atmospheres. *Journal of food protection*, 68(12), 2686-2692.
13. Yost, C. K. y F. M. Nattress, "Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef", *Int. J. Food Microbiology*. Vol. 72, 2002, pp. 97-105.

NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA ACUMULACION DE BIOMASA EN CRECIMIENTO INICIAL EN ARROZ CV. MORELOS A-98

Robert Vilchis-Zimuta¹, Fernando C. Gómez-Merino^{1*}, Jericó Bello-Bello², Gabriel Alcántar-González¹, Disraeli Eron Moreno-Guerrero³, Sara M. Ramírez-Olvera¹, Libia Iris Trejo-Téllez¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, vilchis.robert@colpos.mx; fernandg@colpos.mx*; alcantar@colpos.mx; ramirez.sara@colpos.mx; tlibia@colpos.mx; jerico.bello@colpos.mx; ramirez.sara@colpos.mx ²Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, jerico.bello@colpos.mx

³Universidad Autónoma Chapingo, eron151988@gmail.com

RESUMEN

Las nanopartículas de plata (NPsAg) como antisépticos favorecen la germinación y el crecimiento vegetal. En esta investigación se probó el efecto de la aplicación de 0, 40, 80 y 120 ppm NPsAg a semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) cv. Morelos A-98 por 12 min, comparados con benomilo al 2% durante 1 h; e hipoclorito de sodio al 5% durante 1 h; como testigo se aplicó agua destilada. En los tratamientos con 80 y 120 ppm NPsAg el crecimiento inicial del vástago fue superior en 40.47 y 38.72%, respectivamente; mientras que, el benomilo fue de 14.32% y con hipoclorito de sodio éste se redujo en 60.7%, en todos los casos respecto al testigo. La aplicación de 40, 80 y 120 ppm NPsAg incrementaron la longitud de raíz en 30.76, 72.02 y 59.78% respectivamente; mientras que con benomilo, este incremento fue de 52.59%; por el contrario, con el hipoclorito de sodio se redujo el crecimiento de la raíz en 17.3%. La aplicación de 80 ppm NPsAg produjo la media más alta para peso de biomasa tanto fresca como seca de vástago, seguido de la aplicación de 120 ppm NPsAg. El menor peso de biomasa fresca de raíz se observó en plantas tratadas con 40 ppm NPsAg y benomilo en comparación con el testigo; asimismo, en el tratamiento 40 ppm NpsAg se presentó el menor peso y en biomasa seca para raíz. Se concluye que la aplicación de 80 y 120 ppm NPsAg promueve el crecimiento inicial en arroz, siendo 80 ppm NPsAg la concentración adecuada para promover el crecimiento inicial en el cultivar Morelos A-98.

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una de las monocotiledóneas cultivables, muy importante agroalimentariamente, es un alimento básico para más de la mitad de la población mundial, más de 4.000 millones de personas dependen del arroz para al menos el 20% de sus necesidades diarias de calorías. (Fernández-Da Silva *et al.*, 2017).

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los principales cultivos alimenticios del mundo, situándose en el segundo lugar de importancia entre los cereales a nivel mundial, después del trigo. La demanda de semillas de arroz, punto de partida de la producción de arroz, está aumentando constantemente (Molina *et al.*, 2011).

Durante el primer mes de 2017, México importó 111 mil 640 toneladas de arroz con un valor de 29 millones 200 mil dólares, reportado en las cifras oficiales, las importaciones de arroz se dispararon 21.4% (González, 2017).

Por otra parte, las nanopartículas de plata (AgNPs) se utilizan cada vez más en diversas áreas, por su propiedades biológicas también se aplica en la agricultura (Calderón-Jiménez *et al.*, 2017). Las AgNPs mejoran la velocidad de germinación en semillas de cacahuete. Los efectos beneficiosos de las AgNPs podrían atribuirse a una mayor producción de enzimas responsables de las reacciones metabólicas. Por otra parte, podrían incrementar los niveles de ácido indolacético (AIA), en las raíces o brotes, que a su vez pueden aumentar el vigor de las semillas y por ende el crecimiento de plántulas (Dimkpa *et al.*, 2015).

En este contexto, el presente trabajo busca alternativas e integra las recomendaciones del uso de AgNPs y su influencia en el crecimiento inicial de plantas de arroz cv. Morelos A98.

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron semillas del cultivar arroz Morelos A-98 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) obtenidas del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Zacatepec, Morelos, México.

Las semillas se desinfectaron con diferentes tratamientos. El primero consistió en inmersión en etanol 70% por 10 min, después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente las semillas se incubaron por 1 h en NaClO 5% con Tween® 20 (Hycel, Zapopan, México); posteriormente, se dejaron secar sobre papel filtro estéril.

Un segundo lote de semillas, se sumergió en soluciones de nanopartículas de plata (NPsAgAgroVit®) a concentraciones de 40, 80 y 120 ppm, por 12 minutos; posteriormente, se dejaron secar sobre papel filtro estéril.

Un tercer lote de semillas se sumergió en Benomilo® a una concentración de 2 % durante 1 hora; posteriormente, se dejaron secar sobre papel filtro estéril.

Como tratamiento testigo semillas se trataron con agua a destilada.

Las semillas se colocaron las semillas en contenedores plásticos transparentes desechables, con dimensiones de 11 x 11 x 8 cm, al que se le colocó un papel filtro de 10 x 10 cm y se la añadió 15 mL de agua destilada estéril.

Las cajas se depositaron en oscuridad a 28 °C por 3 d, después fueron expuestas a la luz natural. Se tuvieron tres repeticiones por tratamiento. Cada 2 días se adicionaron 15 mL de agua destilada estéril. La unidad experimental fue el contenedor de plástico transparente con 10 semillas.

Se evaluó durante 6 d la germinación, considerando como semilla germinada aquella con radícula de 2 mm de longitud. El crecimiento inicial se midió 10 días después de la siembra, determinando altura de plántula, longitud de raíz, peso de la biomasa fresca y seca de parte aérea y raíz.

Los datos se evaluaron con análisis de varianza y prueba de comparación de medias con la prueba de Tukey utilizando los procedimientos PROC ANOVA y PROC GLM. En las pruebas estadísticas aplicadas se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ (SAS, 2011).

RESULTADOS

En los tratamientos con 80 y 120 ppm NPsAg el crecimiento inicial del vástago fue superior en 40.47 y 38.72%, respectivamente; mientras que, el benomilo fue de 14.32% y con hipoclorito de sodio éste se redujo en 60.7%, en todos los casos respecto al testigo (**Figura 1**).

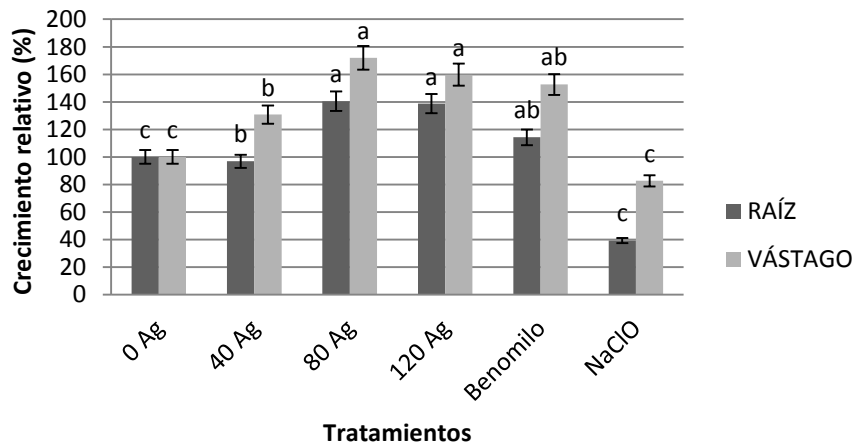


Figura 1. Influencia de los tratamientos de desinfección de semillas con nanopartículas de plata, benomilo e hipoclorito de sodio en el crecimiento inicial de plántulas de arroz cv. Morelos A-98.

Medias \pm DE con la misma letra en cada órgano, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05).

La aplicación de 80 ppm NPsAg produjo la media más alta para peso de biomasa tanto fresca como seca de vástago, seguido de la aplicación de 120 ppm NPsAg. El menor peso de biomasa fresca de raíz se observó en plantas tratadas con 40 ppm NPsAg y benomilo en comparación con el testigo; asimismo, en el tratamiento 40 ppm NPsAg se presentó el menor peso y en biomasa seca para raíz (Figura 2).

Estos resultados se deben a que las NPsAg mejoran el metabolismo del almidón en plántulas de arroz por que inducen la absorción de agua más rápido en el proceso de imbibición, en un experimento similar al evaluar de actividad de α -amilasa y azúcares totales solubles después de 6 días de germinación de la semillas de arroz, tratadas con NPsAg a concentraciones de 10 y 20 mg L⁻¹ aumentan significativamente la actividad de α -amilasa en plántulas de arroz en comparación con el control. La actividad de α -amilasa de plántulas aumentó 2.6 y 2.5 veces en con NPsAg a 10 y 20 ppm respectivamente, en comparación con el tratamiento testigo; mientras que, las actividades de α -amilasa con tratamientos de AgNO₃ en concentraciones de 10 y 20 ppm no fueron significativamente diferentes al testigo. Del mismo modo, se indujo el contenido de azúcar soluble total de 2.0 a 2.2 veces mediante tratamientos de nanopartículas a 10 y 20 ppm en comparación con el testigo, mientras que en tratamientos con AgNO₃, los azúcares solubles totales permanecieron casi sin cambios comparados con el control (Mahakham *et al.*, 2017). Contrario a lo aquí observado, Thuesombat *et al.* (2014) mencionan que la inmersión de semillas de arroz en un rango de concentración de 10 a 100 ppm NPsAg durante 24 h, afecta la germinación y el crecimiento de arroz.

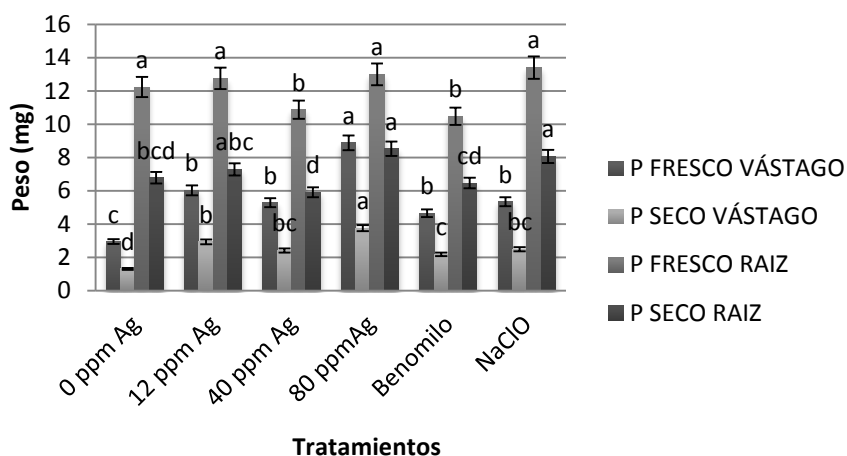


Figura 2. Peso de biomasa fresca y seca de vástago y raíz de plántulas de arroz cv. Morelos A-98. Provenientes de semillas desinfectadas con nanopartículas de plata, hipoclorito de sodio y benomilo. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias estadísticas (Tukey, 0.05).

CONCLUSIONES

La desinfección de semillas de arroz cultivar Morelos A-98 con NPsAg en concentraciones de 80 y 120 ppm, tiene efectos positivos en el crecimiento inicial de plántulas de arroz.

BIBLIOGRAFÍA

1. B. Calderón-Jiménez, M. E. Johnson, A. R. Montoro-Bustos, K. E. Murphy, M. R. Winchester, J. R. Vega-Baudrit, "Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological" Challenges", *Frontiers in Chemistry*, 2017, 5, 6, pp. 1-26.
2. J. Molina, M. Sikora, N. Garud, J. M. Flores, S. Rubinstein, A. Reynolds, P. Huang, S. Jackson, B. A. Schaal, "Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2011, 108, pp. 8351-8356.
3. G. S. González, "México triplicó importación de arroz en 2016: BdeM". *La Jornada*, p. 2. <http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2017/05/01/mexico-triplico-importacion-de-arroz-en-2016-bdm>

4. P. Theerakulpisut, "Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles", *Scientific Reports*, 2017, 7, 8263.
5. P. Thuesombat, S. Hannongbua, S. Akasit, S. Chadchawan, "Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 104, pp. 302-309.
6. R. Fernández-Da Silva, P. Ramírez, J. Silva, V. Storaci, L. Cuamo, Z. De Guglielmo, G. Smits, "Establecimiento de un sistema de selección *in vitro* de variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.) resistentes al hongo *Pyricularia grisea*", *Acta Biológica Colombiana*, 2017, 22, 1, pp. 85-100.
7. SAS Institute Inc., SAS/STAT Users Guide. Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA), 2011.

FOSFITO EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE TOMATE BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

Guevara O., B. K.¹; Casasola E., C. A.¹; Trejo T., L. I.¹;
Alcántar-González, G.¹; Gómez M., F.C.¹; García M., S.²

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México –Texcoco.56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

²CONACYT-CIATEJ Plant Biotechnology. Camino Arenero 1227. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México.

RESUMEN

Diversos estudios han reportado un efecto inhibitor del fosfito (Phi) del crecimiento en algunas especies de plantas sin embargo, el conocimiento de las causas de éste es limitado. En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del Phi en parámetros de crecimiento (altura de planta y longitud de raíz; número de hojas; volumen de raíz y diámetro de tallo) de plántulas de tomate variedad Cid. El estudio se realizó en un invernadero tipo túnel con cubierta de plástico. Las dos concentraciones de fosfito evaluadas fueron 0 y 0.0375 mol₍₊₎ m⁻³ a partir del ácido fosforoso (H₃PO₃), y se suministraron vía radicular a las plántulas de tomate adicionándolas a la nutritiva de Steiner al 25% durante 21 días. Cada tratamiento tuvo 14 repeticiones las cuales fueron vasos de plástico individuales con una capacidad de 60 mL. La adición de Phi a la solución nutritiva incrementó de manera significativa el número de hojas por plántula y el volumen de raíz; por el contrario no afectó la altura de planta y el diámetro de tallo. Los resultados obtenidos permiten concluir que en fase de plántula de tomate variedad Cid, el Phi no inhibe el crecimiento; por el contrario, incrementa dos variables de importancia en la calidad de plántulas como lo son el número de hojas y el volumen del sistema radicular.

INTRODUCCIÓN

El fosfito (Phi) es un análogo estructural del fosfato (Pi) que es eficientemente absorbido por el sistema de transporte de Pi y rápidamente movilizado por el xilema y el floema de las plantas (López-Arredondo y Herrera-Estrella, 2013).

Los fosfitos (Phi) son sales metálicas de ácido fosforoso que son capaces de provocar resistencia adquirida sistémica (SAR) en algunas especies de plantas y también pueden presentar toxicidad directa contra diferentes patógenos, *Phytophthora* spp., *Streptomyces scabies*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, la aplicación de Phi a las plantas las protege de las infecciones especialmente por los oomicetes y también contra otros patógenos de la planta, tales como *Venturia inaequalis*, *V. pirina*, *F. solani* y *Erwinia carotovora*. Muchos de estos compuestos se denominan frecuentemente biopesticidas y son respetuosos con el medio ambiente (Simonetti *et al.*, 2015), varios estudios de laboratorio recientes demuestran que la aplicación de compuestos de fosfito mejoran la defensa de las plantas (Liljeroth *et al.*, 2016) incluso han dado como resultado mejores rendimientos para algunas especies vegetales, estos efectos beneficiosos han llevado a la hipótesis de que Phi también tiene propiedades nutricionales como fuente de fósforo (P) para las plantas, sin embargo numerosos informes han demostrado que las células vegetales son incapaces de metabolizar el Phi, evitando su uso como una fuente directa de P, además se han reportado efectos negativos del tratamiento Phi en el crecimiento de plantas para muchas especies, incluyendo *Arabidopsis*, tomate, *Brassica nigra*, pimiento y maíz; Los efectos negativos mediados por Phi se han observado tanto en condiciones de cultivo de tejidos como cuando se incorporan al suelo o se aplican como tratamientos foliares en condiciones de campo (López-Arredondo y Herrera-Estrella, 2013).

En este contexto, el presente trabajo de investigación evaluó el efecto del Phi en parámetros de crecimiento de plántulas de tomate variedad Cid.

PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se realizó en un invernadero tipo túnel con cubierta plástica. Durante la fase experimental se registró una temperatura mínima promedio de 15.21 °C y una temperatura máxima promedio de 29.75 °C, con una HR media de 14.16% durante el día y de 36.58% durante la noche y un punto de rocío promedio de 9.13 °C. El sustrato utilizado fue la perlita. Se

utilizó semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad El Cid, lote: E65175, material para investigación de la casa comercial Harris Moran.

Los tratamientos evaluados consistieron en dos soluciones nutritivas a las que se agregaron dos concentraciones de fosfito (Phi, H_2PO_3^-) a partir de ácido fosforoso (H_3PO_3 , Sigma Aldrich Merck, Germany),: 0 y 0.0375 mol/L, estas concentraciones corresponden a 0 y 15% del P total como fosfato en la solución de Steiner al 25% (Steiner, 1984). El pH de las soluciones nutritivas se calibró utilizando un medidor portátil de pH, conductividad y temperatura modelo PC18, México y fue ajustado a 5.5 utilizando NaOH 1 N o H_2SO_4 1 N.

Se empleó un diseño experimental completamente al azar (DECA), para cada tratamiento se colocaron 14 repeticiones obteniéndose un total de 84 unidades experimentales las cuales fueron vasos de plástico individuales (Bosco™) con una capacidad de 60 mL cada uno. Después de 21 días de aplicación de tratamientos se determinaron las variables siguientes: Altura de planta y longitud de raíz se determinaron usando una regla de 50 cm. Número de hojas. Volumen de raíz, mediante el método de desplazamiento de volumen usando una probeta de vidrio (Pyrex) de 250 mL. Diámetro de tallo con un vernier digital (Truper, CALDI-6MP, México).

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), corroborando antes que se cumplieran los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianza. Debido a que algunas variables no cumplían con el supuesto de normalidad se recurrió al método de transformación por rangos propuesto por Conover e Iman (1981) para lo cual se utilizó el programa estadístico Statistical Analysis System 9.0 y SAS University Edition (SAS Institute Inc., 2011).

RESULTADOS

El Phi adicionado a la solución nutritiva no tuvo efecto significativo en la altura de plántulas de tomate tratadas, respecto al testigo (Figura 1A). Por el contrario, algunas investigaciones como la realizada por Manna *et al.* (2015) demostraron que el aumento de las concentraciones externas de Phi tienen un impacto negativo en el crecimiento de la plántulas de arroz cuando se utilizó KH_2PO_4 o $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a concentraciones de 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mM, durante 15 d de tratamiento a una temperatura controlada de 25 °C.

No existieron efectos significativos en el diámetro de tallos de plántulas de tomate tratadas con Phi, respecto al testigo (Figura 1.1B). Estudios realizados por López-Arredondo y Herrera-Estrella (2013) demuestran que al evaluar previamente líneas transgénicas que expresan el gen bacteriano codificando una fosfito oxidoreductasa (PTXD) observaron diferencias notables entre plantas silvestres y transgénicas en medios que contienen Phi, por lo que decidieron utilizarlo como un marcador dominante seleccionable utilizando Phi como agente selectivo para evaluar la sensibilidad de las plantas de *Arabidopsis* a Phi y así determinar la cantidad mínima y máxima de bioestimulante que se podría utilizar cultivando semillas en un medio sólido que contenía una concentración de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 3 y 5 mM Phi como la única fuente de P, y bajo todas las concentraciones de Phi probadas se observó una inhibición efectiva en el crecimiento de plantas silvestres como se informó anteriormente; asimismo, las plántulas silvestres mostraron efectos negativos inducidos por Phi incluyendo amarillamiento de hojas, tallos raquíticos, raíces primarias cortas y raíces laterales muy cortas o abortadas. Incluso en las concentraciones de Phi más bajas, el crecimiento de plantas silvestres fue detenido en la etapa cotiledonar o de 4 hojas, y las plantas murieron de 10 a 12 días después de la germinación; por el contrario, plantas transgénicas mostraron un vigoroso crecimiento en todas las concentraciones de Phi, sin diferencias notables entre las líneas con alta o baja expresión.

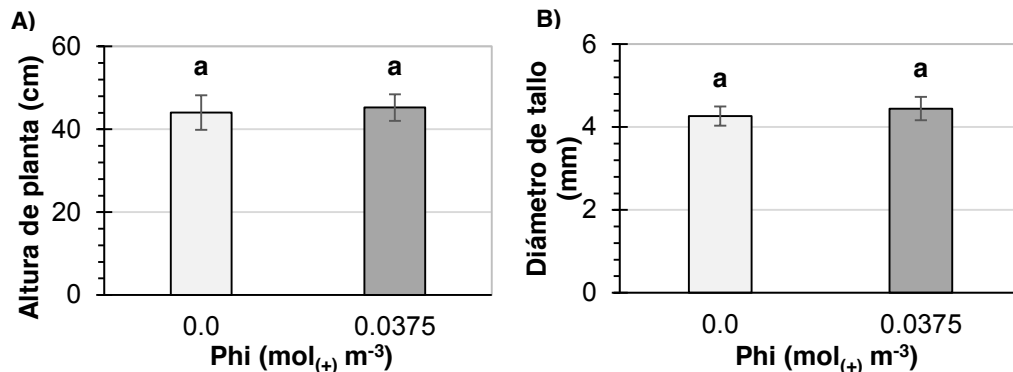


Figura 1. Altura de planta de tomate (A) y diámetro de tallo (B) en respuesta al tratamiento con fosfito (Phi) en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas de cada subfigura son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). Altura de planta ($P=0.1374$), diámetro de tallo ($P=0.1868$).

Los datos de número de hojas no cumplieron con el supuesto de normalidad (Figuras 2A y 2a); por tanto, apoyados en la metodología de transformación por rangos de Conover-Iman se tiene evidencia suficiente para concluir que existe un incremento significativo en cuanto el número de hojas por plántulas de tomate tratadas con Phi, respecto al testigo sin Phi (Figura 2a).

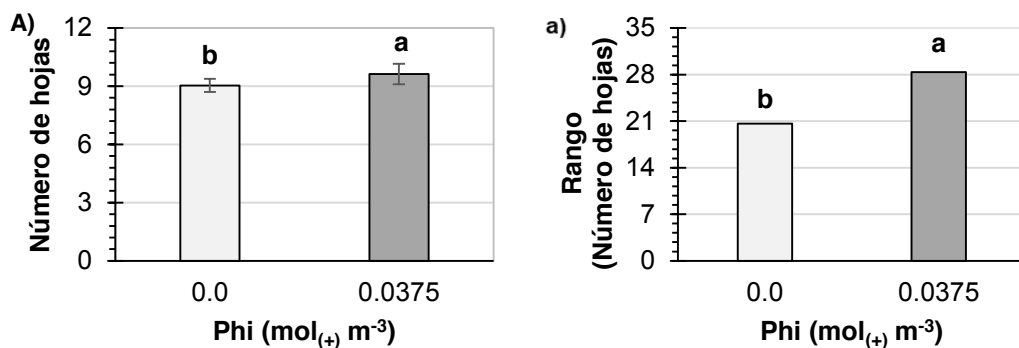


Figura 2. Número de hojas por plántula de tomate en respuesta a fosfito (Phi) [A: medias ($P=0.0250$); a: medias transformadas por rangos de Conover-Iman ($P=0.0256$)]. Medias \pm DE y rangos con letra distinta de cada subfigura son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Los efectos del Phi fueron significativos en la longitud de raíz de plántulas de tomate (Figura 3). Algunos investigadores como son Jost *et al.* (2015) observaron que en plántulas de *Arabidopsis* sembradas en medios con deficiencia y suficiencia de P, las raíces crecieron a tasas similares, pero las raíces primarias de las plántulas tratadas en un medio con Phi mostraron tasas de crecimiento mucho más bajas durante un periodo de 11 d y la elongación cesó completamente en las 48 h siguientes.

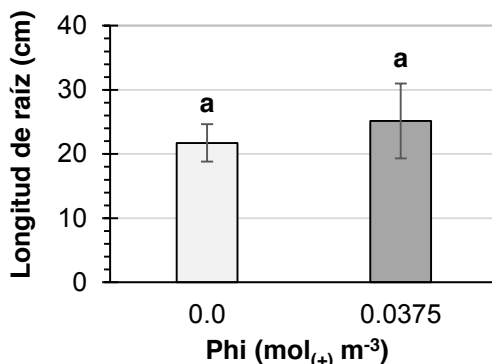


Figura 3. Longitud de raíz de plantas de tomate en respuesta al tratamiento con fosfito (Phi) en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas de cada subfigura son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). Phi ($P=0.2063$), NaCl ($P=0.2496$).

Los datos de volumen de raíz de plántulas de tomate no cumplieron con el supuesto de normalidad (Figura 4A). Por lo anterior, apoyados en la metodología de transformación por rangos de Conover-Iman se muestra que el fosfito tuvo influencia significativa en el volumen de raíz por planta, respecto al testigo sin fosfito (Figura 4a).

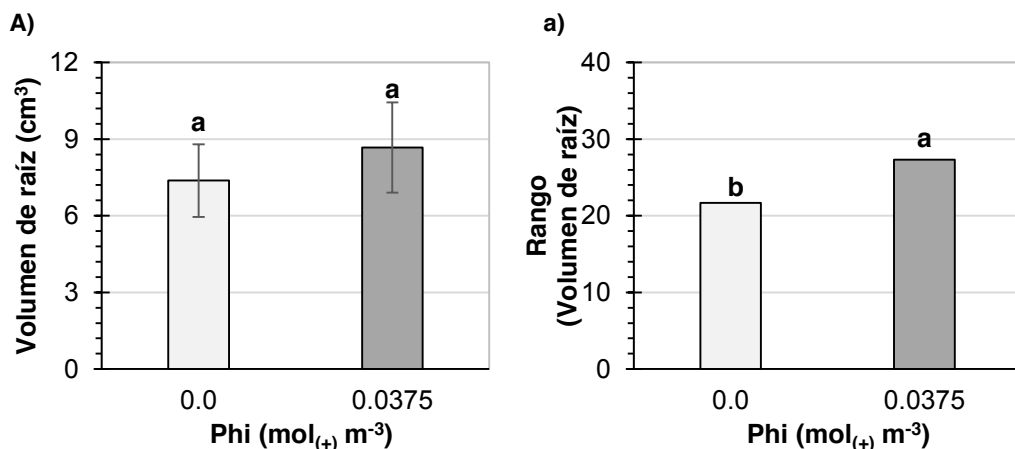


Figura 4. Volumen de raíz por planta de tomate en respuesta a fosfito (Phi) [A: medias ($P=0.2036$); a: medias transformadas por rangos de Conover-Iman ($P=0.0251$)]. Medias \pm DE y rangos con letras distintas en cada subfigura son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

En el presente estudio de investigación se posee evidencia suficiente para demostrar que aporte de fosfito (Phi) a dos concentraciones 0.0 y 0.0375 (mol₍₊₎ m⁻³) vía radicular en la solución nutritiva de Steiner al 25% afectó de manera significativa y positiva el número de hojas y el volumen de raíz.

BIBLIOGRAFÍA

1. D. L. López-Arredondo, L- Herrera-Estrella, "A novel dominant selectable system for the selection of transgenic plants under *in vitro* and greenhouse condition based on phosphite metabolism", *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 11, 4, 2013, pp. 516-525.
2. E. Liljeroth, A. Lankinen, L. Wiik, B. D. Dhar, E. Alexandersson, E. Andreasson, "Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials", *Crop Protection*. Vol. 86, 2016, pp. 42-55.
3. E. Simonetti, V. N. Pin, M. Montecchia, C. Zilli, K. Balestrasse, M. Carmona, "Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root rot of soybean", *Microbiological Research*., Vol. 180, 2015, pp. 40-48.

4. M. Manna, T. Islam, T. Kaul, R. C. Subramanyam, D. Fartyal, D. James, M. K. Reddy, "A comparative study of effects of increasing concentrations of phosphate and phosphite on rice seedling", *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 37, 258, 2015, pp. 1-10.
5. R. Jost, M. Pharmawati, H. R. Lapis-Gaza, C. Rossig, O. Berkowitz, H. Lambers, F. M. Finnegan, "Differentiating phosphate-dependent and phosphate-independent systemic phosphate-starvation response networks in *Arabidopsis thaliana* through the application of phosphite", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 66, 2015, pp, 2501-2514.
6. SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3 User's Guide. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc.
7. W. J. Conover, R. L. Iman, "Rank transformation as a bridge between parametric and nonparametric statistics", *The American Statistician*, Vol. 35, 3, 1981, pp. 124-129.

CALIDAD DE LOS TALLOS FLORALES DE LISIANTHUS VAR. MARIACHI BLUE TRATADOS CON LANTANO

Nadia Issaí Torres-Flores¹, Libia I. Trejo-Téllez¹, Gabriel Alcántar-González¹, Fernando C. Gómez-Merino¹, Brenda I. Trejo-Téllez², Prometeo Sánchez-García¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ²Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. e-mail: nadia.torres@colpos.mx

RESUMEN

Esta investigación se evaluaron los efectos de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3] y de cuatro concentraciones de éste (0, 10, 20 y 30 μM), en parámetros de calidad de tallo (longitud de botón LB, diámetro de flor DF y longitud de tallo LT) durante el desarrollo del ciclo del cultivo en *lisianthus* var. *Mariachi Blue*. Se tuvieron ocho tratamientos con seis repeticiones, la unidad experimental fue una planta en una bolsa de polietileno negro con tezontle y agrolita como sustrato. Las fuentes de La fueron adicionadas en la solución nutritiva Steiner al 50% y se realizaron tres riegos semanales de 200 mL por unidad experimental. La concentración de La tuvo influencia significativa en la longitud de botón; particularmente, la concentración 30 μM incrementó en 4% esta variable, en comparación con el testigo. El factor fuente de La no fue significativo en los parámetros de calidad evaluados. En lo que respecta a la interacción, el tratamiento consistente en 20 μM $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ incrementó en 6 % la longitud de botón, en 7% el diámetro de flor y en 4% la longitud de tallo, comparadas con el testigo. Asimismo, destaca el aumento en 3% ocasionado en la longitud del tallo en plantas tratadas con 30 μM LaCl_3 , respecto al testigo; sin embargo éste no fue estadísticamente significativo. Se concluye que las aplicaciones de La como $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en la solución nutritiva son una alternativa para favorecer los parámetros de calidad evaluados en la variedad *Mariachi Blue* de *lisianthus*.

INTRODUCCIÓN

Las flores son un bien suntuario, de lujo, prescindible; por lo tanto, su consumo va en directa relación con el poder adquisitivo de la población; el *lisianthus* es una especie de flor de corte nueva que está en el mercado por su estilo muy característico en colores de pétalos (Cajilema, 2006).

Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Raf.) es una planta herbácea perenne, originaria del sur de los Estados Unidos, que es utilizada como flor de corte debido a sus flores grandes y atractivas, tallos largos y de prolongada duración en jarrones; en la actualidad existe una tendencia al alza en su producción (Uddin *et al.*, 2004).

Entre las prácticas agronómicas que se realizan al cultivo, el raleo de varas se considera parte esencial, porque sirve para seleccionar los tallos más vigorosos. Si el raleo no se realiza se obtiene un aumento del número de varas, pero éstas son más delgadas y cortas, y no tienen valor comercial, es decir no se cumple con los estándares de calidad de los tallos florales (Sotomayor *et al.*, 2011).

En este contexto, esta investigación tuvo como objetivo la evaluación de variables de calidad (longitud de botón, diámetro de flor y longitud de tallo), en tallos de *lisianthus* var. *Mariachi Blue*, durante el desarrollo del ciclo del cultivo, en respuesta a dos fuentes y cuatro concentraciones de lantano (La) aplicadas en la solución nutritiva de Steiner.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó bajo condiciones de invernadero, en la cual se utilizaron plántulas de *lisianthus* de la variedad *Mariachi Blue*, adquiridos en la empresa Plántulas de Tetela, S de RL de CV. Se utilizó como sustrato una mezcla de tezontle de 5-8 mm + Agrolita® (70/30, v/v), en bolsas de polietileno negro de 30 x 30 cm, donde se trasplantó un plántula por bolsa, considerándose como una unidad experimental. Los tratamientos de La evaluados fueron suministradas en la solución nutritiva de Steiner al 50% (Steiner, 1984). La aplicación de los tratamientos se inició 15 días después del trasplante (ddt), aplicando 200 mL por bolsa tres veces por semana. El diseño de tratamientos utilizado fue factorial 4 X 2 con un arreglo completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Por tanto, se evaluaron ocho tratamientos, resultado de la combinación de cuatro concentraciones de La (0, 10, 20 y 30 μM) y de dos fuentes de La [$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y LaCl_3].

Las variables evaluadas se determinaron durante el desarrollo del ciclo del cultivo, la longitud de botón se registró al inicio de la floración, mientras que el diámetro de flor y la longitud de tallos se

registraron al momento de plena floración; es decir cuando la flor presentó su máxima apertura (Figura 1). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (LSD, $P \leq 0.05$ %) empleando el software Statistical Analysis System (SAS, 2002).



Figura 1. Variables de calidad evaluadas. A) Longitud de botón floral, B) diámetro máximo de flor y C) longitud de tallo en lisianthus Mariachi Blue.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La longitud de botón incrementa en 4% en plantas tratadas con 30 μM La, respecto al testigo. El diámetro de la flor y la longitud de tallo no fueron influenciadas de manera significativa por los tratamientos con La (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efectos de la concentración de La en la solución nutritiva de Steiner al 50%, en las variables de calidad de los tallos florales de lisianthus var. Mariachi Blue.

La, μM	Longitud de botón, cm	Diámetro de flor, cm	Longitud de tallo, cm
0	5.2 b	7.8 a	39.7 a
10	5.1 b	7.9 a	39.5 a
20	5.3 ab	8.0 a	40.2 a
30	5.4 a	8.0 a	38.6 a

Medias con letras distintas en cada columna, son diferentes estadísticamente (LSD, $P \leq 0.05$).

Las fuentes de La evaluadas no tuvieron efectos significativos en las variables de calidad evaluadas como se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Efectos principales de las fuentes evaluadas, en las variables de calidad de los tallos florales de lisianthus var. Mariachi Blue, en la solución nutritiva de Steiner al 50%.

Fuente de La	Longitud de botón, cm	Diámetro de flor, cm	Longitud de tallo, cm
LaCl ₃	5.2 a	7.8 a	40.0 a
La(NO ₃) ₃ 6H ₂ O	5.3 a	8.0 a	39.0 a

Medias con letras distintas en cada columna, son diferentes estadísticamente (LSD, $P \leq 0.05$).

La longitud de botón fue superior en 6% en plantas tratadas con 20 μM La(NO₃)₃ 6H₂O, comparado con el testigo. Asimismo, se observó en ambas fuentes de La, que las concentraciones más bajas de este elemento presentaron las longitudes de botón más pequeñas (Figura 2).

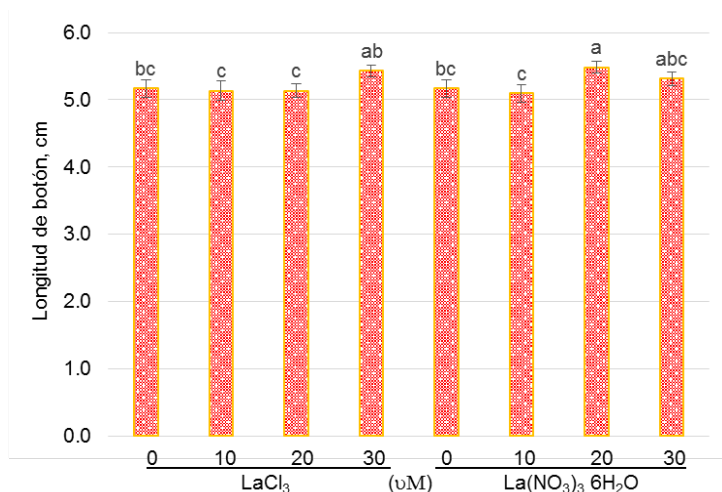


Figura 2. Longitud de botón en lisianthus Mariachi Blue, en respuesta a la aplicación de fuentes y concentraciones de lantano. Barras \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (LSD, $P \leq 0.05$).

El tratamiento con 20 μ M de La(NO₃)₃ 6H₂O incrementó en 7% el diámetro de la flor, respecto al testigo como se observa en la Figura 3.

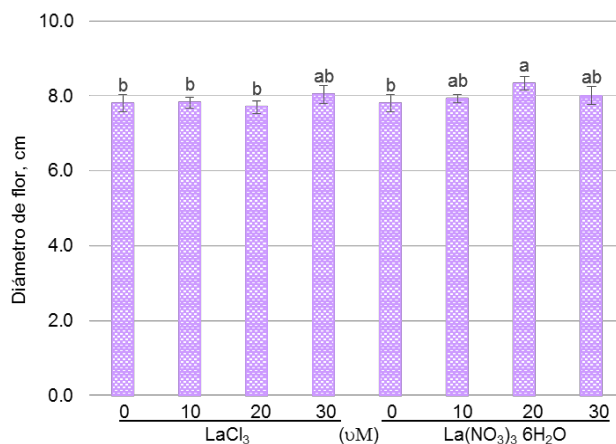


Figura 3. Diámetro de flor en lisianthus Mariachi Blue, en respuesta a la aplicación de fuentes y concentraciones de lantano. Barras \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (LSD, $P \leq 0.05$).

En la variable longitud de tallo (Figura 4), los tratamiento 30 μ M La(NO₃)₃ 6H₂O y de 20 μ M LaCl₃ presentaron un aumento del 4% en ambos casos, comparados con el testigo; sin embargo dicho incremento no es significativo.

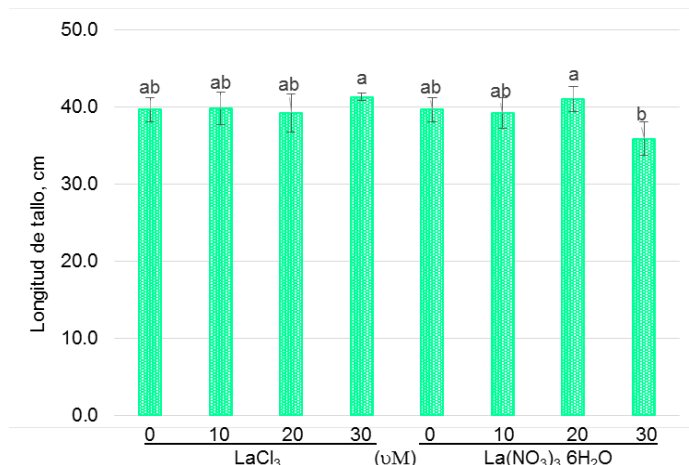


Figura 4. Longitud de tallo en lisianthus Mariachi Blue, en respuesta a la aplicación de fuentes y concentraciones de lantano. Barras \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (LSD, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIÓN

Se concluye que las aplicaciones de La como $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en la solución nutritiva son una alternativa para favorecer los parámetros de calidad evaluados en la variedad Mariachi Blue de lisianthus.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. L. Cajilema Vinuesa. Diagnóstico Internacional de flores frescas de corte y Estudio de Factibilidad de Lisianthus (*Lisianthus spp.*) como alternativa de Producción en la Provincia de Córdoba, Argentina. Tesis: Ingeniero en gestión de Agronegocios. Honduras. 2006.
2. A. Steiner, "The universal nutrient solution", in: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. 1984. pp. 633-649.
3. E. M. Sotomayor León; M. R. Escobar Tolosa y C. A. Rosas Guerra. Propagación del Lisianthus cv. Azul por esquejes en macetas de turba bajo nebulización, con distintas concentraciones de ácido β -indolbutírico, en el Valle de Azapa. Idesia. 2011. 29(1):99-102.
4. J. A. Uddin; F. M. F. Hashimoto; T. Miwa; K. Ohbo and Y. Sakata. Seasonal variation in pigmentation and anthocyanidin phenetics in commercial *Eustoma* flowers. -Sci. Hort. 2004. 100:103-115.
5. SAS. SAS High-Performance Forecasting 2.2: User's Guide. (Vol. 1 & 2). Cary, NC: SAS Institute Inc. Ver. 9). 2002. 652 p.

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS EN EL MAÍZ AZUL TZIRANTZA DE LA REGIÓN DE PARACHO

María De Jesús Juárez Ayala¹, Berenice Yahuaca Juárez¹, Martha Isabel Hajar Mateos¹ y Consuelo de Jesús Cortés Penagos¹

¹Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tzintzuntzan 173, Col. Matamoros, 58240 Morelia, Michoacán. México.
Correo-E: marryjua_5@hotmail.com

RESUMEN

El maíz constituye el 40% de los alimentos del mundo, representando el tercer cereal de mayor importancia en la nutrición humana. México se posiciona en el cuarto productor de maíz en el mundo con un 3% de la producción total. Los maíces pigmentados poseen un valor nutricional agregado por su alto contenido en compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides: Ácidos fenólicos y antocianinas, compuestos responsables de los colores azul, púrpura y rojo en plantas comestibles, principalmente en cereales y frutas, su estabilidad depende de la presencia de iones metálicos (Ca^{2+}) y temperatura, afectadas en el proceso de nixtamalización. El objetivo es realizar un análisis físico (1.- Tamaño del Grano: Alto, Ancho y Espesor, 2.- Color: Chroma y H^0 , 3.- Peso Hectolitrico) para caracterizar el maíz azul tziranza y determinar la concentración de antocianinas, de la región de paracho. En base a los resultados de la variables analizadas: presenta una tonalidad azul verdoso, tamaño de grano [alto: 1.2 +/- 0.12 mm, ancho : 1.00 +/- 0.09 mm, Espesor: 0.52 +/- 0.25 mm], peso hectolítrico (78.75 ± 0.28 g/ml) y una concentración de antocianinas (1274.2 ± 0.79 mg/kg), indicando que el maíz azul tzirantza de la región de Paracho es de endospermo suave apto para la nixtamalización (NMX-FF-034/1-2002) tecnología utilizada ampliamente en América, para la obtención de una gran variedad de productos derivados (tortillas, botanas, atoles.), considerado pequeño, característico de los maíces criollos y con pigmento tipo antociano (azul), presentando mayor actividad antioxidante por la concentración de antocianinas [1274.2 +/- 0.79 mg/kg], en comparación a otros cereales como trigo, arroz y avena, por lo cual, poseen importantes actividades biológicas como antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas, además de ser colorantes inocuos (antocianinas) para el consumo humano, aplicados ampliamente en la industria alimenticia.

INTRODUCCIÓN

El maíz constituye la base de la alimentación para la mayor parte de los países en desarrollo. El maíz pertenece a la especie *Zea* de la familia de las gramíneas, y es una planta anual dotada de un amplio sistema radicular fibroso (FAO, 1993). Las variedades criollas de maíz presentan granos pigmentados de múltiples colores, y se encuentran dentro de las 59 razas descritas. Los colores de granos encontrados principalmente en las variedades pigmentadas son: amarillo, negro, morado, azul, rojo y naranja, aunque existen otras tonalidades.

México es el cuarto productor de maíz en el mundo con un 3 % de la producción total. El primer lugar lo ocupa Estados Unidos (40 %), seguido por China (19 %) y Brasil (6 %). Las variedades de maíz cultivadas en México son: blanco y amarillo o forrajero y pigmentado. Los estados productores en México de maíz azul son: Jalisco, Edo. de México, Sinaloa, Chiapas y Michoacán. A los maíces pigmentados se les ha otorgado un valor agregado debido a su alto contenido en compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides, entre los que destacan las antocianinas y los ácidos fenólicos. Además, en varios estudios se ha destacado el perfil de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante de distintas variedades. El maíz contiene mayor cantidad de fenoles y capacidad antioxidante que otros cereales como trigo, arroz y avena (. El grano de maíz con pigmento tipo antociano (rojo, azul, morado y negro) debe su coloración a las antocianinas. Éstas, además de ser colorantes inocuos para el consumo humano, poseen importantes actividades biológicas como antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas.

TEORÍA

Las antocianinas pertenecen a los flavonoides, un subgrupo importante de los compuestos fenólicos (CF) y son pigmentos ampliamente distribuidos en las plantas. Estos compuestos son los responsables de los colores azul, púrpura y rojo en plantas comestibles, principalmente cereales y

frutas. El tipo de antocianidina formado depende del grado o nivel de hidroxilación o metoxilación del anillo (B) de la molécula. El color de las antocianinas depende del número y posición de los grupos sustituyentes en la molécula. Un aumento en la cantidad de grupos hidroxilo produce pigmentos de tonos azules, y por el contrario, con predominancia de grupos metoxilo se presenta una tonalidad roja (Escalante, A *et al.*, 2013). Las antocianinas pueden encontrarse en forma acilada debido a la acilación de los residuos de azúcares con derivados de ácidos orgánicos alifáticos. Las formas no aciladas son menos estables que las antocianinas que presentan uno o más grupos acilo.

La estabilidad de las antocianinas depende principalmente de la presencia de luz, oxígeno, pH, presencia de iones metálicos (Ca^{2+}) y temperatura, razón por la que los maíces que contienen estas biomoléculas son difíciles de procesar.

La nixtamalización es el principal proceso de transformación del maíz para su consumo, esta tecnología es utilizada ampliamente en América para la obtención de una gran variedad de productos (tortillas, botanas, atoles, entre otros). El proceso de nixtamalización tradicional involucra cambios químicos, estructurales y nutricionales en los diversos constituyentes del grano. La nixtamalización requiere de largos periodos de tiempo y el uso de gran cantidad de agua, que da como subproducto al líquido denominado "nejayote" cuyo pH es elevado y contiene gran cantidad de material orgánico. Durante el procesamiento por NT (nixtamalización) el maíz es sometido a condiciones de alto contenido humedad, calor (80 a 105 °C) y un pH elevado (11 a 12). La NT reduce significativamente el contenido de antocianinas en los maíces pigmentados, pérdida que se debe a que gran cantidad de estos compuestos se solubilizan en el agua de cocción con pH elevado y temperatura extrema, lo que degrada a los compuestos. Además, otras estructuras químicas derivadas de los poli fenoles son afectadas por el rompimiento de enlaces éster, y como consecuencia se liberan los fenoles a la solución de cocimiento. La mayor parte de estos compuestos se encuentran en el pericarpio del grano, y son eliminados durante el lavado del nixtamal. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo de investigación determinar el efecto de las condiciones de cocción térmico alcalina y la temperatura de cocción de la tortilla de maíz azul sobre el contenido de antocianinas, ácidos fenólicos y actividad antioxidante.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Se utilizó Maíz azul (tziranza) de la región de Paracho, Michoacán.

Caracterización del Grano:

1. Tamaño del Grano

Para determinar el tamaño del grano se midió el largo, ancho y espesor del centro del grano. Se midieron 25 granos tomados al azar. Se utilizó un vernier Digimatic, con rango de medida de 0.01-150 mm. Los datos se reportaron como el valor promedio y la desviación estándar de las mediciones.

2. Peso de 100 Granos.

Se tomaron 100 granos al azar y se pesaron en la micro balanza Ohaus Explorer, con una capacidad de 0-210 g, y precisión de ± 0.001 g. Se realizó por triplicado cada medición, se obtuvo la media y la desviación estándar de los datos.

3. Peso Hectolítrico.

Para la obtención de esta medida se siguió la técnica 55-10 de la AACC (1983). Se vertieron los granos en un recipiente de aluminio de volumen conocido, pesándose en la micro balanza Ohaus Explorer, con una capacidad de 0-210 g, y una precisión de ± 0.001 g. El peso hectolítrico se obtuvo al dividir el peso de los granos entre el volumen del recipiente y relacionándolo a un volumen de 100 litros. Las mediciones se hicieron con 10 repeticiones, se reportó la media y la desviación estándar.

4. Color del Grano de Maíz.

Para medir objetivamente el color en los alimentos que son translúcidos se utiliza el método tri estímulo Hunter L,a,b. Este método se basa en la determinación, por reflexión de la luz, de tres parámetros. El parámetro "L", que mide el grado de luminosidad y varía desde 100 para el blanco perfecto a 0 para el negro; los parámetros "a" y "b", son indicativos de la cromaticidad, los valores positivos de "a", están relacionados con el color rojo y los negativos con el color verde; mientras que los valores positivos del parámetro "b", están asociados con el color amarillo y los negativos con el azul.

Para la medición de los granos de maíz se utilizó un colorímetro Mca. Hunter Lab MiniScan, procediéndose de la siguiente forma: el colorímetro se calibró con una placa blanca de porcelana. Los granos de maíz se colocaron en un contenedor de cuarzo, para su medición en el equipo. Las lecturas se realizaron por serie n=10 con respecto a cuatro posiciones localizadas 90° una respecto a la otra. Se midieron los valores de L , a , y b . Para determinar el tono, el cual puede ser calculado por Hue° (ecuación 1) y la saturación del color, calculado a través de Chroma (Ecuación 2). El cual nos muestra la separación de los tonos grises y se acerca a un color puro del espectro.

Ecuación 1

$$Hue^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b}{a} \right) \text{ Si } a > 0 \text{ y } b = 0$$

Ecuación 2

$$C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Cuantificación de Antocianinas

Se utilizó metanol con ácido clorhídrico al (99:1) como solvente (1ml), se dejó reposar de 24 horas con la muestra pulverizada (0.05g), se llevó a agitación vortex durante 3 minutos y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos, y el sobrenadante se colocó en un tubo cubierto de aluminio y se continuó agregando 1ml del solvente y el proceso se repitió hasta su total extracción y el sobrenadante se llevó al espectrofotómetro a 715nm y como blanco se utilizó el solvente, y se realizó el cálculo correspondiente para determinar la cantidad de antocianinas presente en las muestras, se realizó respecto a la curva de cianidina 3-glucósido.

Ecuación 3

$$\frac{g}{L} = \frac{DO_{Absorbancia\ Máxima} \times PM_g \times F}{\epsilon}$$

Dónde:

ϵ : es el coeficiente de extinción molar de cianidina (32000), en una celda de cuarzo de 1cm de longitud, de un gramo de un compuesto con un peso molecular de 287.24, diluido en 10ml de solvente.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la caracterización del grano de maíz azul tziranza de la región de Paracho, se presentan en la Tabla 1. El tamaño del grano es considerado pequeño, el cual, es característico de los genotipos de maíces criollos, basado en la norma mexicana NMX-FF-034/1-2002, el tamaño en el grano presenta gran influencia en la hidratación, ya que un grano pequeño tiene mayor hidratación. El peso hectolítrico indica que es un maíz de endospermo suave apto para la nixtamalización (NMX-FF-034/1-2002). El peso hectolítrico coincide con lo reportado por Aguayo en la literatura (J. *et al.*, en el 2012), reportando un peso hectolítrico de (78.4±0.21) g/ml para maíz azul. El peso de cien granos hace referencia al tamaño del grano relacionado con su consistencia, los resultados muestran que se trata de un grano suave, coincidiendo con Salinas - Moreno (2012), donde reporta para diferentes razas de maíz azul un valor de 37.2 g.

Tabla 1. Caracterización Del Grano de Maíz Azul Tziranza De La Región de Paracho.

Análisis	Resultado
Tamaño del Grano	Alto: 1.2 ± 0.12 mm Ancho: 1.0 ± 0.09 mm Espesor: 0.5 ± 0.2 mm
Peso Hectolítrico	78.75 g/ml ± 0.28 g/ml
Peso de 100 granos	37.0940 g ± 0.0002 g
Tonalidad	Verde - Azul
Concentración De Antocianinas	1274.2 ± 0.79 mg/kg

El maíz azul tziranza de la región de Paracho, contiene una mayor cantidad de antocianinas (1274.2 ± 0.79), equivalente al triple, comparando con lo reportado por otros autores. Por ejemplo, de la Parra *et al.*, 2007, hizo una comparación con maíces de diferentes colores blanco, amarillo, rojo y azul, en el cual referencia que el maíz azul es el que contiene mayor cantidad de antocianinas (368.7 mg/kg), mientras que Del pozo Insfran *et al.*, 2007, en su estudio que consistió en la comparación de maíz azul Mexicano (342.2 mg/Kg) y maíz azul Americano (260.9 mg/kg), cita que el azul Mexicano contiene ligeramente una mayor cantidad de antocianinas comparado con el azul Americano, es decir que dependiendo del Cultivar, será la cantidad de antocianinas.

CONCLUSIONES

El Maíz Azul Tziranza De La Región de Paracho, contiene alta actividad antioxidante, proporcionada principalmente por las antocianinas (1274.2± 0.79 mg/kg), en específico por la cianidina 3-glucosido, contiene alrededor de tres veces más antocianinas que otros maíces, de endospermo suave apto para la nixtamalización (NMX-FF-034/1-2002) tecnología utilizada ampliamente en América, para la obtención de una gran variedad de productos derivados (tortillas, botanas, atoles.), considerado pequeño, característico de los maíces criollos y con pigmento tipo antociano (azul) poseen importantes actividades biológicas como antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas, además de ser colorantes inocuos (antocianinas) para el consumo humano, aplicados ampliamente en la industria alimenticia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguayo, J., Mora, S., Cuevas, E., Serna, S., & Gutiérrez, J. (2012). Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas after lime-cooking extrusion process of whole pigmented Mexican maize. *Plants Food Human Nutr* 67, 178-185.
2. Castañeda- Sánchez, A. (2012). Propiedades nutricionales y antioxidantes del maíz azul. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 5-2, 75-83.
3. Damián, M., Cruz, A., Ramírez, B., Romero, O., Moreno, S., & Reyes, L. (2013). Maíz, alimentación y productividad: Modelo tecnológico para productores de temporal en México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 157-176.
4. Esacalante, A., Ramírez, B., Torres, P., Barrón, M., Figueroa, J., & López, J. (2013). La nixtamalización y el efecto en el contenido de antocianinas de maíces pigmentados, una revisión. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol.36 (4), 429-437.
5. Guerrero, G., Loarca, G. F., Mendoza, S. O., Ramos, M., Reinoso, R., & Figueroa, J. (2012). Efecto del consumo de tortilla del maíz pigmentado (*Zea Mays L.*) en indicadores de riesgo de cáncer de colon. *Revista electronica de Divulgación de la investigación. Revista de la Universidad del SABES* vol. 2, 1-6.
6. Guerrero, G., Loarca, G. F., Mendoza, S. O., Ramos, M., Reinoso, R., & Figueroa, J. (2012). Efecto del consumo de tortilla del maíz pigmentado (*Zea Mays L.*) en indicadores de riesgo de cáncer de colon. *Revista electronica de Divulgación de la investigación. Revista de la Universidad del SABES* vol. 2, 1-6.

DETERMINACIÓN DE FE EN BARRAS DE CEREAL. UN PROPUESTA PARA LA ENSEÑANZA PRÁCTICA DE LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (AAS) CON ATOMIZACIÓN POR LLAMA.

María de Jesús Santa Gutiérrez Ponce

Instituto de Química Aplicada de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec
mgutierrez@unpa.edu.mx

RESUMEN

La absorción atómica en llama es una técnica de análisis instrumental, que permite la determinación cuantitativa y selectiva de la mayoría de los elementos químicos conocidos. Presenta gran sensibilidad y detectabilidad lo que la hace una herramienta necesaria para el químico moderno en el análisis elemental. Por otro lado, es de suma importancia que el alumno universitario conozca esta técnica, entendiendo el fundamento teórico de la misma y el manejo apropiado del equipo. Debido a la escasez de material didáctico sobre el tema, el presente trabajo tuvo como objetivo elaborar un material adecuado para la enseñanza práctica de la AAS, usando de base lo encontrado en la literatura¹.

OBJETIVO

Realizar análisis de minerales (Hierro) en muestras de alimentos (barras integrales) por absorción atómica con llama.

INTRODUCCIÓN

El hierro, es un oligoelemento fundamental para el desarrollo de la vida en los animales, una de sus funciones principales es formando parte de la hemoglobina, para el transporte de oxígeno a las células por parte de los glóbulos rojos.

El hierro que se toma de los alimentos puede ser hemínico (si se encuentra como grupo hemo) o no hemínico: Fe, Fe (II) o Fe (III), que se encuentra en verduras de hoja, frutos secos, legumbres, etc. Muchos de los alimentos que actualmente se comercializan se presentan enriquecidos con nutrientes, muchos de ellos el hierro.

Los cereales del desayuno son uno de los alimentos que han sufrido la incorporación masiva de hierro a su composición; en el presente trabajo se determinó hierro en barras de cereales. ¹

La técnica AAS

La técnica de AAS en flama en una forma abreviada consta de los siguientes pasos: la muestra en forma líquida es aspirada a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador donde ésta se desintegra y forma un rocío o pequeñas gotas de líquido. Las gotas formadas son conducidas a una flama, donde se produce una serie de eventos que originan la formación de átomos. Estos átomos absorben cualitativamente la radiación emitida por la lámpara y la cantidad de radiación absorbida está en función de su concentración. La señal de la lámpara una vez que pasa por la flama llega a un monocromador, que tiene como finalidad el discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura. Instrumentación.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES:

- 1 matraz volumétrico de 500 mL.
- 6 matraces volumétricos de 100 mL.
- 7 matraces de Erlenmeyer de 125 mL.
- 2 Morteros con pistilo mediano.
- 3 parrillas de calentamiento y agitación.
- 1 piceta con agua desionizada.
- 6 magnetos de agitación.
- Un rollo de papel aluminio.
- Un kit de limpieza.
- 2 espátulas.

1 vaso de precipitado de 1 L.
1 probeta de 100 mL.
7 frascos de plástico con taparrosca.

REACTIVOS:

Ácido nítrico concentrado. H_2O_2
Agua desionizada.

MUESTRAS:

Barra de cereales con Linaza
Barra de cereales "con Chia

METODOLOGIA

A continuación se enumeran los pasos de la práctica

1. Con tiempo previo a la práctica se dejó todo el material de cristal reposando con HNO_3 a 20% durante 20 h.
2. Se trituraron las muestras con ayuda del mortero.
3. Después de las 20 h de reposo se retiró todo el contenido de HNO_3 de los materiales.
4. Se prepararon dos muestras, el primer analito correspondía a una de barra de linaza (muestras 1 a 3) y el segundo analito correspondía la barra de chía (muestras A-C).
5. En tres charolas de aluminio se colocaron las muestras y posteriormente se pesaron.
6. Se llevó a cabo la desionización del agua destilada.
7. Se rotularon cada uno de los matraces A para la réplica 1, B para la réplica 2, C para la réplica 3, y posteriormente se les agregó 10 mL de HNO_3 .
8. Una vez que los matraces ya contenían el HNO_3 se les agregó las cantidades correspondientes de la muestra de la barra de chía, aproximadamente 1 g.
9. Una vez listos los matraces con el HNO_3 y los analitos correspondientes se les agregó un agitador magnético y posteriormente se sometieron a una temperatura de $28^\circ C$ con una velocidad de agitación de 1 para llevar a cabo la digestión ácida.
10. La posición de las muestras en la parrilla se fue alternando con respecto a la homogenización de cada una de ellas.
11. Después de que las 3 muestras se homogenizaron se dejaron en la parrilla hasta que cada una se tornó más clara (casi transparente) 8 h.
12. Una vez aclarada cada muestra, estas ya se encontraban listas, se transvasaron cuantitativamente a matraces aforados de 50 mL.
13. La solución 1000 ppm de Fe se preparó al agregar 0.3617g de $Fe(NO_3)_3$ a un matraz aforado de un litro y se procedió a aforar con agua desionizada.
14. Una vez aforado el matraz de 1000 ppm se tomaron 10 mL y posteriormente se agregaron a un matraz de 100 mL para preparar una solución 20 ppm de Fe.
15. El contenido del matraz de 20 ppm se traspasó a una bureta de 25 mL.
16. Se prosiguió con la rotulación de los 5 matraces aforados de 100 mL para llevar a cabo las respectivas diluciones necesarias, obteniéndose las 5 soluciones (los estándares) para poder obtener una curva analítica entre 0.3 a 2.0 mg L^{-1} Fe
17. Una vez que se prepararon las soluciones de las muestras y estándares se prosiguió con el análisis de cada una de ellas por AAS.
18. Para llevar a cabo el análisis se utilizó el equipo de absorción atómica, Perkin Elmer AAnalyst 200.

RESULTADOS

En la siguiente imagen se presentan los resultados de la concentración para las soluciones estándar

Calibration data for Fe 248.33 Equation: Nonlinear Through Zero

ID	Mean Signal (Abs)	Entered	Calculated	Standard Deviation	%RSD
		Conc. ng/L	Conc. ng/L		
Blanco	0.000	0	0.000	0.00	0.06
Uno	0.019	0.3	0.315	0.00	1.89
Dos	0.044	0.8	0.746	0.00	0.42
Tres	0.069	1.2	1.183	0.00	0.73
Cuatro	0.090	1.6	1.572	0.00	0.25
Cinco	0.117	2.0	2.080	0.00	0.41

Correlation Coef.: 0.996979 Slope: 0.06046 Intercept: 0.00000

En la siguiente figura se muestran los valores obtenidos al analizar las muestras rotuladas como A, B y C

Sequence No.: 11 Sample ID: muestra A Analyst:			Sequence No.: 12 Sample ID: muestra B Analyst:			Sequence No.: 13 Sample ID: muestra C Analyst:		
Replicate Data: muestra A			Replicate Data: muestra B			Replicate Data: muestra C		
Repl	SampleConc mg/L	StdConc mg/L	Repl	SampleConc mg/L	StdConc mg/L	Repl	SampleConc mg/L	StdConc mg/L
1	1.222	1.222	1	1.276	1.276	1	1.551	1.551
2	1.233	1.233	2	1.272	1.272	2	1.546	1.546
3	1.217	1.217	3	1.277	1.277	3	1.552	1.552
Mean:	1.224	1.224	Mean:	1.275	1.275	Mean:	1.550	1.550
SD:	0.0080	0.0080	SD:	0.0028	0.0028	SD:	0.0033	0.0033
%RSD:	0.65%	0.65%	%RSD:	0.22%	0.22%			

De manera semejante se obtuvieron los valores para las muestras identificadas como 1, 2 y 3.

Replicate Data: Muestra 1			Replicate Data: Muestra 2			Replicate Data: Muestra 3		
Repl	SampleConc mg/L	StdConc mg/L	Repl	SampleConc mg/L	StdConc mg/L	Repl	SampleConc mg/L	StdConc mg/L
1	2.579	2.579	1	2.226	2.226	1	1.025	1.025
2	2.537	2.537	2	2.196	2.196	2	1.026	1.026
3	2.490	2.490	3	2.171	2.171	3	1.023	1.023
Mean:	2.535	2.535	Mean:	2.196	2.196	Mean:	1.025	1.025

Después de las primeras lecturas fue necesario diluir las muestras 1, 2 y 3 cinco veces para poder determinar su concentración dentro del intervalo lineal de la curva analítica propuesta. Por último, fueron realizados los cálculos necesarios y se determinó que las barras de cereal contenían: 14.6 mg en cada 100 g para las barras con linaza y de 6.8 mg en cada 100 g para las barras con Chía.

CONCLUSIÓN

Fue posible hacer la determinación de Fe en barras de cereal, una vez que se logró adecuar las condiciones de digestión de la muestra, así como, las cantidades necesarias de la misma. Siendo dichas condiciones: un gramo de barra de cereal, perfectamente homogeneizado por molienda mecánica, y una digestión mixta con HNO₃ concentrado y H₂O₂ por 8 horas, con calentamiento y agitación. El intervalo lineal de trabajo fue de 0.3 a 2.0 mg L⁻¹ Fe con coeficiente de correlación de 0.9969. Se determinó que las barras de cereal contenían 14.6 mg en cada 100 g para las barras que

contenían linaza y de 6.8 mg en cada 100 g para las barras que contenían Chía. En conclusión se consiguió una metodología viable para la implementación de una práctica que proporciona al alumno una idea clara de los procesos necesarios para la realización de un análisis químico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ríos Castro, A., Moreno Bondi M. C., Simonet Suau B. M. (coordinadores) Técnicas espectroscópicas en química analítica, Volumen II, Espectrometría atómica, de iones y electrones. Ed. Síntesis, España 2012, 314p.

CAPACIDAD MICROBICIDA Y ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS A PARTIR DE CÁSCARA DE GRANADA (*PUNICA GRANATUM*)

Jesús Alberto Coronado Reyes¹, Consuelo de Jesús Cortes Penagos², Juan Carlos González Hernández^{3*}

^{1,2} Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tzintzuntzan 173. Col. Matamoros, Morelia, Michoacán, 58240, México. E-mail: ibq_jacoronadoreyes@outlook.com, ccpenagos@yahoo.com, ³ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia, Avenida Morelos Norte 1500. Col. Lomas de Santiago, Morelia, Michoacán, 58120, México. *E-mail: jcgh1974@yahoo.com.

RESUMEN

La granada (*Punica granatum*) es una planta nativa de Irán que pertenece a la familia de las *Punicaceae* y se caracteriza por genera un fruto considerado como una baya grande donde en su interior contiene numerosas semillas envueltas en una pulpa rosada (parte comestible) y que esta recubierta por una piel brillante y gruesa (desecho) cuya importancia recae en que dentro de su composición (tallo, hoja, flores, cáscara, jugo y semilla) se encuentran sustancias fitoquímicas, como compuestos fenólicos y terpénicos, con propiedades antioxidantes así como microbicida, dichos compuestos pueden extraerse mediante una extracción líquido-líquido o sólido-líquido obteniéndose aceite esencial, sin embargo, su aprovechamiento se ha centrado en la extracción de la parte comestible del fruto, flores y tallo además de que no se han estudiado a profundidad las variedades cultivadas en los principales estados productores de México que en su mayoría se encuentran en la zona centro del país, por lo cual, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad microbicida y antioxidantes de aceite esencial de cáscara de granada obtenido a través de dos métodos de extracción uno empleando arrastre con vapor de agua y otro con el método Soxhlet donde para este último se utilizarán dos solventes de extracción a diferentes concentraciones en mezcla con agua permitiendo evaluar con cuál de los dos métodos se consigue un mayor rendimiento de extracto obtenido y de esta manera proponer un aprovechamiento integral del fruto.

INTRODUCCIÓN

La granada (*Punica granatum*) pertenece a la familia *Punicaceae* y es una planta nativa de Irán [1]. Esta planta se caracteriza por brindar una baya grande de color amarillento a rojo llamada granada y en donde en su interior hay numerosas semillas envueltas en una pulpa rosada siendo la parte comestible y desechándose la cáscara. En la granada se ha determinado la presencia de compuestos antioxidantes y microbicidas por métodos analíticos extraídos en forma de aceite esencial en prácticamente todas las partes de árbol utilizando extracciones líquido-líquido o líquido-sólido, observándose que los componentes más importantes están en la corteza y raíces como son los flavonoides y tanino, los antioxidantes más abundantes [2], sin embargo, no se ha profundizado en la extracción de compuestos en la cáscara del fruto. Además de estos compuestos se ha encontrado que la granada contiene antocianinas y ácido elágico, con igual actividad antioxidante protegiendo a las células de la oxidación [3] ya que al consumirse favorecen a la salud al reducir el estrés oxidativo y aterogenesis [4]. Se han observado también actividad antifúngica y antibacterial en extractos de semilla, jugo y cáscara, probándose solo contra *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger* [5], así como valoraciones de la acción in vitro del jugo de granada sobre bacterias enteropatógenas como *E. coli* y *Salmonella enteritidis* [6]. Es por esto por lo que se extraerán compuestos fenólicos de la cáscara de granada ya que además de contenerlos no tiene un aprovechamiento como tal debido a que la cáscara se desecha, empleando para ellos dos métodos de extracción analizando con cuál se tiene un mayor rendimiento de extracto obtenido y una mayor actividad antioxidante y microbicida.

TEORÍA

Un antioxidante queda definido como toda sustancia que hallándose presente en bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable (biomolécula) retarda o previene la oxidación de este sustrato [7]. Por otro lado, los radicales libres son especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo,

dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad y cuya acción es en el sitio cercano a donde se generó [8]. Por tanto, el mecanismo de acción de un antioxidante consiste en colisionar con el radical libre para cederle un electrón debilitando su acción y en algunos casos como con la vitamina E puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otro antioxidante, dichos antioxidantes se clasifican en: exógenos que son aquellos que ingresan al organismo a través de la cadena alimentaria y los endógenos que son sintetizados por la célula [7]. La capacidad antioxidante de un compuesto de interés se puede medir por diferentes métodos in vitro como el método de ABTS y DPPH los cuales se basan en la captación de los radicales libres 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico ácido) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, respectivamente, por los analitos y la aplicación de cada método estará en función del disolvente empleado para la extracción de dichos compuestos de interés. El método ABTS monitorea la desaparición del catión ABTS⁺ generado previamente por la oxidación del ABTS, por el descenso de la absorbancia, debido a la presencia de compuestos capaces de interactuar con el radical, este ensayo es aplicable tanto para sustancias lipofílicas como hidrofílicas utilizando como control positivo Trolox [9]. En cuando al método de DPPH se genera el radical de DPPH y hay una deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización le otorga una coloración violeta de tal manera que cuando la disolución de DPPH entra en contacto con una solución que puede donar un átomo de hidrógeno se produce la forma reducida DPPH-H con una consecuente pérdida de color y por tanto hay una pérdida de absorbancia [10] con respecto de una inicial que fue medida siendo proporcional a la concentración por tanto de la sustancia antioxidante. Lo que respecta a la capacidad microbicida se ha observado que la alta concentración de compuestos como los flavonoides, los fenoles, las antocianinas y los ácidos orgánicos pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, en específico, los compuestos fenólicos pueden ser absorbidos por la membrana celular interactuando con enzimas, sustratos y algunos iones metálicos [11] afectando por tanto el desarrollo de los microorganismos. Los elagitaninos y el ácido elágico es el potencial biológico que poseen en contra de microorganismos, se he reportado que extractos de plantas como *Pteleopsis hylodendron* contienen principalmente derivados de ácido elágico activos contra ciertas bacterias patógenas como *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Salmonella pyogenes* [12].

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo contempla primeramente una caracterización fisicoquímica de granada de diferentes variedades proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Irapuato Guanajuato en estado maduro, para lo cual, en cuanto a fisiología se medirán los ejes ecuatoriales y longitudinales del fruto, el color de la cáscara usando un colorímetro (ColorFlex), firmeza con un texturómetro (TA-XT2i), pH, sólidos solubles totales (°Brix), acidez titulable siguiendo la norma mexicana NMX-F-102-S-1978 y porcentaje de cenizas con la norma NMX-F-066-1978. Posteriormente se aplicará un diseño exploratorio de superficie de respuesta 2² más 3 puntos centrales a dos factores (temperatura y tiempos) para el secado de la cáscara y obtener un polvo del que se harán extractos por maceración con metanol y acetona a diferentes concentraciones con agua para medir la capacidad antioxidante (variable de respuesta usando el método del ABTS⁺ y reforzando los resultados cuantificando fenoles totales con el método de Folin-Ciocalteu) estableciendo la mejor condición donde no se afecte la muestra y que sea por tanto la condición de trabajo para todo el proyecto. El polvo obtenido se almacenará en bolsas ziploc a temperatura ambiente y protegidas de la luz solar. Como tercer paso, se realizará la extracción de aceite esencial de la cáscara pulverizada usando método por arrastre de vapor y extracción por solventes (método Soxhlet) a concentraciones diferentes en mezcla con agua para determinar con cuál de ellos se consigue un mayor rendimiento de extractos y continuar con la valoración de la capacidad antioxidante y microbicida por método de DPPH y ABTS⁺ y método de halo de inhibición respectivamente usando para esta última prueba cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

RESULTADOS

En la actualidad se han colectado 3 lotes de granada en estado maduro de diferentes variedades y 1 lote en estado inmaduro con ayuda del INIFAP las cuales son variedades Wonderful, Apaseo y Tecomatlán, esta última evaluada en dos estados distintos de maduración y serán representadas

con las siglas VWM, VAM, VTM y VTI respectivamente. Lo primero que se realizó fuera una caracterización morfológica del fruto generándose los siguientes resultados.

Tabla 1.- Morfología de cuatro variedades del fruto de granada (Punica granatum).

Lotes	Peso (g)		Diámetro ecuatorial (cm)		Diámetro longitudinal (cm)		Grosor cáscara (cm)			
					Parcial	Total				
VWM	405.36 ± 34.1	a	9.01 ± 0.2	a	8.55 ± 0.16	a	10.28 ± 0.48	a	0.32 ± 0.03	c
VAM	460.85 ± 50.49	a	9.51 ± 0.48	a	8.53 ± 0.33	a	10.53 ± 0.91	a	0.32 ± 0.02	c
VTM	95.99 ± 5.17	b	7.95 ± 0.43	b	6.91 ± 0.43	b	8.77 ± 0.17	b	0.47 ± 0.03	a
VTI	100.26 ± 4.79	b	7.34 ± 0.32	b	6.58 ± 0.46	b	8.07 ± 0.46	b	0.39 ± 0.02	b

$n=12$, $\alpha=0.05$, a , b y c semejanza entre medias analizadas.

Como se puede observar hay una clara diferencia entre VWM y VAM con respecto de VTM y VTI al ser obtenidas de proveedores distintos, pero lo que hay que destacar es que como lo que interesa es la cáscara de granada se deben de trabajar con las variedades con dimensiones mayores para poder tener buenos rendimientos al obtener la materia prima, por otro lado, en cuanto al grosor de la cáscara se puede notar que VTM es la que tiene el valor mayor lo cual puede resultar bueno para tener una mayor cantidad de muestra a trabajar, sin embargo, se pudo observar que el secado tomó más tiempo debido a que había una mayor área por la cual tenía que transferirse el agua al igual que sí la cáscara contenía mesocarpio de los gajos estos podrían actuar como reservas de humedad reduciendo la perdida de agua por lo que se deben de retirar [13]. VWM y VAM tuvieron un secado correcto estableciendo que lo recomendable es trabajar con grosor de cáscara aproximadas a ellas. Para la determinación de color se muestra la siguiente figura ubicando en el cromatograma cada una de las variedades trabajadas.

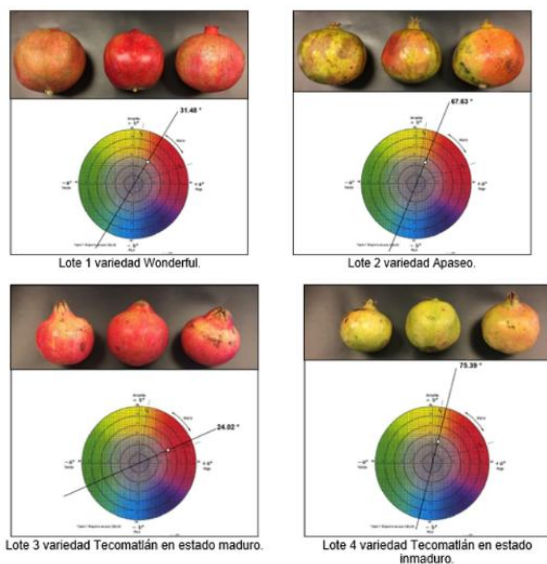


Figura 1.- Determinación de color a las variedades de granada analizadas.

Se puede notar que hay diferencias importantes entre cada variedad por lo que resultaría conveniente hacer una caracterización sobre qué compuestos están presentes en cada una y sí hay una correlación con los datos que se obtengan de la capacidad antioxidante y microbicida, dichas variaciones se pueden deber a la presencia de antocianinas tomándose como estándar de referencia ya que al ser compuestos inestables y susceptibles a degradación al someterse a ciertas temperaturas o a prolongados almacenamientos se generan pigmentaciones marrones [14] así como según la acilación o glicosilación que tengan, el pH del fruto, la presencia de ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno e incluso la luz. Con este parámetro se logró estandarizar cada variedad y será útil para trabajo con futuros lotes.

Lo que respecta a la caracterización fisicoquímica se muestran los siguientes resultados.

Tabla 2.- Caracterización fisicoquímica a cuatro variedades del fruto de granada (*Punica granatum*).

Lotes	Firmeza (N)	pH	Sólidos solubles totales (°Brix)	Ac. Cítrico (mg/ml)	Cenizas en cáscara (%)
VWM	47.91 ± 3.83 ab	1.17 ± 0.23 b	16.84 ± 0.14 a	0.191 ± 0.052 a	1.80 ± 0.19 a
VAM	65.06 ± 7.87 a	1.37 ± 0.08 b	14.93 ± 0.57 b	0.04 ± 0.002 a	1.55 ± 0.40 a
VTM	39.45 ± 11.35 ab	3.67 ± 0.06 a	14.84 ± 0.33 b	0.312 ± 0.05 a	0.93 ± 0.05 b
VTI	48.39 ± 7.73 b	3.30 ± 0.28 a	14.22 ± 0.9 b	0.037 ± 0.004 a	1.67 ± 0.14 a

$n=12$, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

La determinación de la firmeza se realizó con la compresión de la zona ecuatorial del fruto deformándolo 3 mm siguiendo la metodología estandarizada para guayaba en estado verde estandarizando la rigidez de las variedades, se puede observar que hay una disminución al hacer comparativos entre VTM y VTI por lo que se establece que las frutas maduras tendrán que estar en una rango de los 40 N a los 50 N dependiendo de la variedad, dicha variación y pérdida de la firmeza se debe al proceso de modificaciones en la estructura de la pared celular tanto químicas como enzimáticas [15]. Lo que respecta a la acidez iónica la VWM y VAM resultan las más ácidas y es importante medirlo ya que en investigaciones semejantes se reporta junto con la capacidad antioxidante observando si hay un efecto sobre la presencia de compuestos de interés ya que es parámetro relacionado con la madurez. Esta diferencia entre la acidez iónica y sobre todo en las que se ve una disminución del pH se puede deber al aumento de los ácidos orgánicos libres en el fruto [16] lo cual cobra sentido ya que para dar soporte a esta conclusión se midió la acidez titulable y en efecto las variedades que tuvieron un menor pH en el zumo obtenido (VWM) fueron aquellos en los que hubo una mayor presencia de ácido cítrico. Por otro lado, cuando hay un aumento en el pH lo que ocurre es que durante el llenado de frutos gran parte de la actividad de acumulación se da por simporte, en donde los iones H⁺ desempeñan un papel importante; estos hacen parte de la formación de sustratos como la sacarosa y la glucosa, y hacen que su concentración a nivel vacuolar disminuya durante las últimas fases de la maduración, por lo que el pH se ve ligeramente aumentado [17]. La presencia de sólidos solubles totales en el jugo del fruto aumenta conforme se desarrolla el fruto, lo cual se comprueba, ya que la VTI fue la que tuvo la menor cantidad debido a que en las variedades maduras hay una hidrólisis de los almidones que se transforman en azúcares, también hay una desaparición de los taninos y otros productos causantes del sabor astringente por la disminución de la acidez debido a la degradación de los ácidos orgánicos. Por tanto, la variación de los sólidos solubles por la conversión del almidón en azúcares es atribuido a un aumento en la actividad de las enzimas hidrolasas del almidón [17]. En comparación con otros trabajos se observa que las muestras trabajadas están dentro de lo reportado por Mercado *et al.*, en el 2011 donde se habían realizado caracterizaciones a variedades de Apaseo. En cuanto a la acidez titulable la VWM es la fruta con mayor grado de madurez, pero, aunque los datos son muy bajos no resulta alarmante ya que, al hacerse las comparaciones con la caracterización realizada por Mercado *et al.*, en el año 2011 los resultados expresados de la misma manera fueron cercanos a estas. La disminución en la acidez titulable es debido a la actividad de las deshidrogenasas y a que los ácidos orgánicos son utilizados como sustratos de la respiración para la síntesis de nuevos componentes durante la maduración, este descenso coincide con el inicio de la maduración y la acumulación de azúcares. Con este parámetro se clasifica al fruto como muy dulces ya que para ser dulces tiene que tener una concentración de 0.317 g por 100 g hasta 2.725 g por 100 g para los agrios [11]. El porcentaje de cenizas en la cáscara de granada no mostró diferencias significativas en la mayoría de las variedades, pero con lo publicado por López *et al.*, en el 2010 se conoce que la cantidad de minerales presente en la parte comestible del fruto es de 0.53 % lo que indica que la cáscara de estas variedades es buena fuente de minerales. Partiendo de la comparación entre el contenido de cenizas de VWM y VAM, los cuales tenían características morfológicas parecidas, se puede observar que VAM tiene una mayor concentración (este es de menor tamaño con respecto a VWM) lo cual se puede explicar ya que las variaciones de los nutrientes en casi todos los frutos se debe a un

fenómeno conocido como efecto de dilución por causa del incremento de los elementos constituyentes de la materia vegetal, entonces a medida que el fruto madura y crece, el contenido de minerales decrece, este comportamiento también se observa al hacer a comparativa entre VTM y VTI [18].

Durante el desarrollo de esta parte experimental se realizaron pruebas preliminares a variedades del municipio de Tarimbaro para observado qué factores eran importante al caracterizar los frutos y lograr un secado adecuado de la cáscara para almacenarla, por lo que en este sentido se había sometido a 40 °C por 72 hrs pero los cortes de la cáscara no se hicieron de manera uniforme estandarizándose finalmente cortes de la cáscara de 1 cm². Debido a que el fruto de la granada es un fruto de temporada, se comenzó con la caracterización de las variedades y secado de la cáscara (basándose en bibliografía), sin embargo, para eliminar la posibilidad de que con esta metodología recomendada de secado se afectaran los compuestos de interés se decidió crear un diseño de compuesto central: 2² con puntos estrellas el cual estudiará los efectos de 2 factores (temperatura y tiempo) en 11 corridas para analizar y concluir si había un efecto con respecto de la capacidad antioxidante durante este secado definiendo a la vez las condiciones de trabajo para el resto de la experimentación. Los resultados tanto del diseño de superficie de respuesta, así como la curva de calibración elaborada para medir la variable de respuesta son los siguientes:

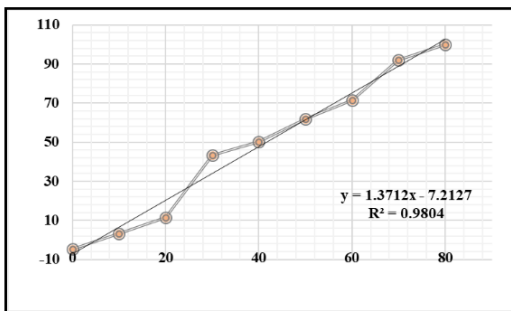


Figura 2.- Curva de calibración para determinación de % de inhibición por método del radical ABTS⁺.

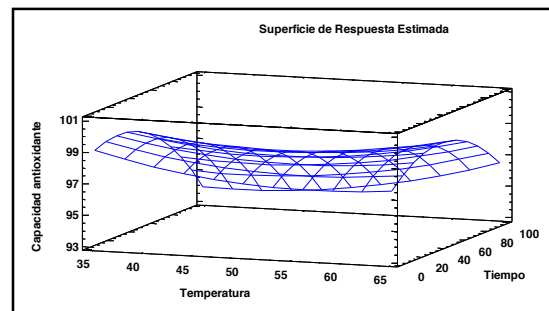


Figura 3.- Gráfico de superficie de respuesta estimada para el secado de cáscara de granada.

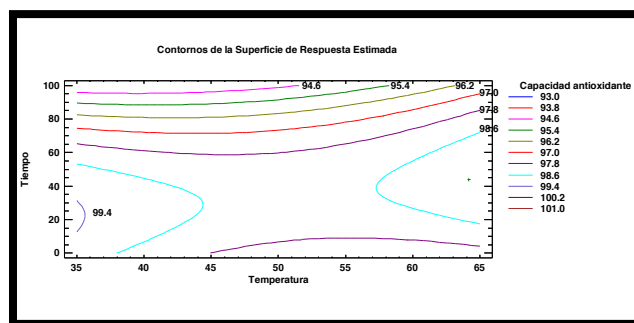


Figura 4.- Contornos de la superficie de respuesta estimada para el secado de la cáscara.

Como se puede observar en la figura 3 el tiempo donde se puede alcanzar la mayor capacidad antioxidante es alrededor de las 40 hrs a una temperatura alrededor de los 55 °C. por lo que con esto se puede reducir el tiempo de secado que se había invertido para los primeros secados y sin el temor de afectar los compuestos fitoquímicos.

Con la figura 4 podemos observar que la mejor capacidad antioxidante que podemos lograr es la de 98.8 % de inhibición y es el más recomendable ya que es en la que podemos trabajar en un rango mayor de temperatura y tiempo alcanzando este valor, cosa que no se puede lograr o que tendría que ser más estricto en el trabajo si se quiere alcanzar el 99.4%, por tanto, se establece el secado de 36 hrs a 55 °C.

Para corroborar si había un efecto importante de manera directa con los fenoles extraídos de la cáscara de granada se cuantificaron los compuestos obteniéndose lo siguiente:

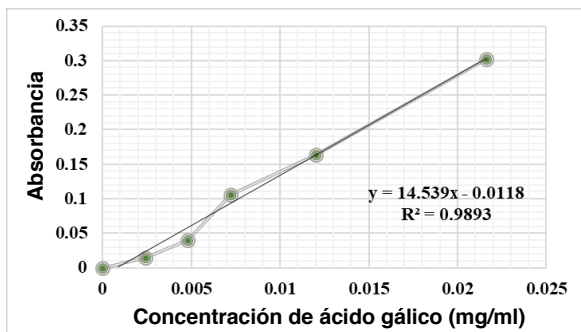


Figura 5.- Curva de calibración para determinación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu.

Tabla 3.- Determinación de fenoles totales en extractos de cáscara de granada.

No. de corrida	Concentración de fenoles totales (mg/ml de ácido gálico)	
1	81.29 ± 0.024	ab
2	81.26 ± 0.008	ab
3	81.34 ± 0.078	ab
4	81.3 ± 0.004	ab
5	81.34 ± 0.007	ab
6	81.25 ± 0.012	ab
7	81.26 ± 0.012	b
8	81.39 ± 0.14	a
9	81.22 ± 0.017	b
10	81.27 ± 0.02	ab
11	81.30 ± 0.081	ab

$n=33$, $\alpha=0.05$, a y b semejanza entre medias analizadas.

Lo que se puede observar es que el comportamiento es similar con respecto del % de inhibición corroborando los resultados, al igual que se puede notar que los extractos con mayor contenido de fenoles totales son los obtenidos de extractos cuya cáscara fue secada al menor tiempo (corrida 8) y la que tuvo la menor concentración fueron las de tiempos prolongados de secado (72 hrs y 81.94 hrs).

CONCLUSIONES

Las pruebas realizadas en la caracterización si permiten la estandarización del estado de maduración al cual se está trabajando ya que hay una relación entre las características del fruto con su desarrollo. Por otro lado, se concluye que el secado de cáscara con el que se trabajó anterior a la aplicación del diseño exploratorio no afectó los compuestos fitoquímicos de interés a extraer ya que los extractos obtenidos a diferentes temperaturas y tiempos de secado no tuvieron una gran variación y mostraron % de inhibición del radical ABTS+ altos, además de que se pudo observar que con rangos probados fuera de los establecidos el mayor daño se veía influenciado por el tiempo debido a que la inhibición del radical fue menor en corridas donde se trabajó con extractos con los tiempos de secado mayores (corrida 7 y 9), lo anterior se ve reforzado con la prueba de fenoles totales cuyo comportamiento fue el mismo y permitió observar a la vez que en la corrida con el menor tiempo de secado (punto estrella) hubo una mayor concentración de fenoles totales, sin embargo, la muestra bajo estas condiciones no quedaba completamente seca y hay mayor riesgo que durante su almacenamiento pueda desarrollar crecimiento de algún hongo. Finalmente se puede concluir hasta el momento que la cáscara de granada contiene cantidades considerables de compuestos fenólicos con capacidad microbicida y antioxidante que pueden ser aprovechados y dar un valor agregado al consumo y producción del fruto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sarkhosh, Z. Zamani, R. Fatahi, A. Ebadi, "RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) genotypes", *Scientia horticulturae*, Vol. 111, 1, 2006, pp. 24- 29.
2. Vidal, A. Fallarero, B. Peña, M. Medina, B. Gra, F. Rivera, Y. Gutiérrez, P. Vuorela, "Studies on the toxicity of *Punica granatum L. (Punicaceae)* whole fruit extracts", *Journal of ethnopharmacology*, Vol. 89, 2-3, 2003, pp. 295- 300.
3. López, E. Palou, "Granada (*Punica granatum L.*): una fuente de antioxidantes de interés actual", *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, Vol. 1, 4, 2010, pp. 64- 73.
4. D. Syed, A. Farrukh, H. Mukhtar, "Pomegranate derived products for cancer chemoprevention", *Seminars in cancer biology*, Vol. 17, 5, 2007, pp. 377- 385.
5. S. Sabbar, M. Naiman, H. Tabassum, K. Mazharuddin, "Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum L.*)", *Journal of agriculture and environmental sciences*, Vol. 9, 3, 2010, pp. 273- 281.
6. J. Guevara, E. Valencia, J. Guevara, "Acción in vitro de frutas y plantas sobre bacterias enteropatógenas", *Anales de la facultad de medicina de la universidad nacional mayor de San Marcos*, Vol. 56, 2, 1995, pp. 36-38.
7. L. García, L. García, D. Rojo, E. Sánchez, "Plantas con propiedades antioxidantes", *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, Vol. 20, 3, 2001, pp. 231- 235.
8. J. Venereo, "Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes", *Revista cubana de medicina military*, Vol. 31, 2, 2002, pp. 126-133.
9. D. Krishnaiah, R. Sarbatly, R. Nithyanandam, "A review of the antioxidant potential of medicinal plant species", *Food and bioproducts processing*, Vol. 89, 2011, pp. 217- 233.
10. P. Molyneux, "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity", *Songklanakarin journal of science and technology*, Vol. 26, 2, 2004, pp. 211- 219.
11. A. Duman, M. Ozgen, K. Dayisoğlu, N. Erbil, C. Durgac, "Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics", *Molecules*, Vol. 14, 2009, pp. 1808- 1817.
12. E. Burboa, J. Ascacio, A. Zugasti, R. Rodríguez, C. Aguilar, "Capacidad antioxidante y antibacteriana de extractos de residuos de candelilla", *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, Vol. 45, 1, 2014, 51- 56.
13. E. Mercado, J. Candelario, L. Rocha, B. Álvarez, "Efectos de condición del fruto y temperatura de almacenamiento en la calidad de granada roja", *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, Vol. 2, 3, 2011, pp. 449-459.
14. Ö. Turfan, M. Türkyilmaz, O. Yemis, M. Özkan, "Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum L.*) juice from sacs and whole fruit", *Food chemistry*, Vol. 129, 4, 2011, pp. 1644-1651.
15. D. Brummell, C. V. Dal Cin, C. Crisosto, J. Labavitch, "Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit", *J. Exp. Bot.*, Vol. 55, 405, 2004, pp. 2029-2039.
16. N. Laguado, E. Pérez, C. Alvarado, M. Marín, "Características fisicoquímicas y fisiológicas de frutas de guayaba de los tipos Criolla Roja y San Miguel procedentes de dos plantaciones comerciales", *Revista de la facultad de agronomía de la Universidad del Zulia*, Vol. 16, 1999, pp. 382-397.
17. J. Álvarez, J. Galvis, H. Balaguera, "Determinación de cambios físicos y químicos durante la maduración de frutos de champa (*Campomanesia lineatifolia R. & P.*)", *Agronomía colombiana*, Vol. 27, 2, 2009, pp. 253-259.
18. E. Rendiles, M. Marín, C. Rincón, O. Ferrer, "Variación en la concentración de minerales en frutos de guayabo (*Psidium guajava L.*) del tipo criolla roja durante su desarrollo", *Revista de la facultad de agronomía de la Universidad del Zulia*, Vol. 21, 1, 2004, pp. 306-313.

EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS PARA USO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Verónica Graciela García Cano¹, Olalla Sánchez Ortiz¹, Julio César Villagrán Ruiz¹, Juan de Dios Terrazas Márquez², Ricardo Alonso Domínguez Mireles²

¹Tecnológico Nacional de México, ²Instituto Tecnológico de Cd. Cuauhtémoc

RESUMEN

Hoy en día la biotecnología ocupa un lugar de gran importancia dentro de los procesos industriales. La utilización de microorganismos para llevar a cabo reacciones determinantes en los métodos de obtención de diversos productos con características específicas es uno de los objetivos de esta investigación, llevada a cabo en el Instituto Tecnológico de Cd. Cuauhtémoc. Consta del aislamiento de levaduras nativas de la manzana cultivada en la región noroeste del Estado de Chihuahua, aisladas específicamente de la variedad Golden delicious, variedad predominante de donde se aíslan las levaduras nativas adaptadas a las condiciones climatológicas frías predominantes de la zona, que al ser un clima frío en promedio anual representará un gran beneficio su utilización en la industria alimentaria de regiones similares. Posterior al aislamiento se lleva a cabo la identificación de las levaduras nativas para aplicación en los procesos productivos alimentarios. Este beneficio representa avances a nivel industrial ya que las temperaturas necesarias para crecimiento, producción enzimática y los procesos fermentativos requieren de un rango de temperaturas que oscila entre 18 a 35 °C, para los cuales se invierte una gran cantidad de recurso en lograr mantener estas condiciones necesarias para llevar a cabo el leudado. A lo que se aísla la levadura nativa y se aplica a los procesos de panificación y vinificación logrando obtener un proceso fermentativo a más bajas temperaturas.

INTRODUCCIÓN

La manzana, fruto del árbol *Malus doméstica*, es cultivada en muchas zonas a nivel mundial, y posee una gran diversidad de variedades, cada una de gran importancia por su valor nutricional. En aspectos de nutrición es una de las frutas más completas ya que 85% de su composición es agua, contiene bastante fibra, y ayuda a moderar los niveles de azúcar en sangre. Además contiene vitamina A, B6, C, E, calcio, hierro, magnesio, nitrógeno, fósforo, potasio, ácido fólico, tiamina y riboflavina.

De acuerdo con el cierre 2016, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) hace énfasis en que la producción a nivel nacional total fue de 716,930 toneladas, con un valor de 4.66 mil millones de pesos, en una superficie cosechada de 54,248 hectáreas. De los cuales el Estado de Chihuahua aportó 81.8% del volumen nacional recolectado, seguido a distancia por Durango y Puebla con 5.9% y 5.2%, respectivamente. Zonas productoras consideradas por la Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) dentro de su Plan Agrícola Nacional 2017-2030, donde algunas de sus estrategias de desarrollo están basadas en la implementación y aplicación de paquetes tecnológicos dirigidos hacia la elevación de la calidad de los productos finales y la diversificación hacia la agroindustria.

Desde la antigüedad diferentes culturas y civilizaciones han venido realizando procesos fermentativos sin tener el pleno conocimiento de lo realizado para la producción de alimentos tales como vinos y panificación. Las levaduras presentes en una fermentación son las responsables de la producción de etanol, alcoholes superiores, enzimas extracelulares, esteroides y otros compuestos solubles que proporcionan características a los productos (Bisson, 1999). Las bebidas alcohólicas tienen su origen en el proceso de fermentación alcohólica. Todo líquido azucarado sufre esta fermentación de manera espontánea debido a la acción de las levaduras que, en ausencia de aire, destruyen la glucosa y otros azúcares produciendo dióxido de carbono y etanol. En la fermentación alcohólica participan diferentes especies de levaduras.

La selección de cepas que habrá de llevar a cabo el proceso fermentativo para la producción de alimentos se basa en los resultados obtenidos de las pruebas para determinar la capacidad de producción de etanol y otros compuestos, así como en la tolerancia a productos que se acumulan, características sensoriales, elasticidad de las masas, porosidad y demás cualidades requeridas para la calidad final de los productos.

Una de las de las grandes ventajas que muestran en general las levaduras nativas es que son resistentes a antibióticos de espectro procariota, así como las condiciones a que se han adaptado, por lo que se extrajo la levadura nativa de la manzana adaptada a las características propias de la región de Cuauhtémoc, en el Estado de Chihuahua. La cual se caracteriza por tener temperaturas bajas pero al ya la sepa estar adaptada a estas temperaturas, puede llevar a cabo un fermentación apropiada aun en temperaturas más bajas de lo que las otras levaduras comerciales pueden lograr, esta levadura obtenida se pretende utilizar en los procesos de panificación y elaboración de vinos con el fin de facilitar la elaboración de estos sin la necesidad de invertir más tiempo del necesario al igual que se busca que el proceso a realizar se lleve de una manera adecuada y satisfactoria.

La levadura nativa de la manzana de Cd. Cuauhtémoc Chihuahua mejora los procesos de fermentación tanto en vinos como en panificación en un ambiente frio ayudando a que la fermentación se lleve a cabo de una manera satisfactoria aun cuando las temperaturas están por debajo de las óptimas para las levaduras comerciales que se utilizan hoy en día, nuestra levadura tal vez no sea igual de rápida pero es igual de efectiva y si consideramos el hecho de que esta trabaja en condiciones frías es una gran ventaja para utilizarse en regiones donde por cuestiones climáticas no se pueden elaborar vinos o cervezas adecuadamente debido a que las levaduras no fermentan como normalmente lo harían en regiones de temperaturas más cálidas, así como también es un hecho de que nuestra levadura ayuda a trabajar en una panadería y dar el mismo rendimiento cuando se tienen bajas temperaturas.

Dado que la mayoría de las levaduras sólo actúan sobre la glucosa mientras que, muy pocas lo hacen sobre la maltosa y la dextrina, en la obtención de alcohol a escala industrial hay que recurrir a hongos ricos en amilasas que hidrolizan el almidón y la dextrina. Algunos de estos hongos prosiguen la transformación, descomponiendo los azúcares obtenidos en alcohol, como lo es el caso del *Aspergillus oryzae* que lo produce.

JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas de la región noroeste del estado de chihuahua, es que no cuenta con las condiciones climáticas apropiadas para llevar a cabo la producción de bebidas alcohólicas de calidad, así como un correcto leudado en la industria de la panificación debido al clima frio que impera en la región.

En lo correspondiente a la calidad de las bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación, hay que destacar el papel que la temperatura de fermentación desempeña en el proceso, pues tiene una gran influencia en la producción de aromas y compuestos volátiles. La temperatura es un factor preponderante para la vida de las levaduras, ya que se desarrollan en una escala de temperaturas relativamente corta, hasta 30°C como máximo y por debajo de 13 o 14° C el inicio de la fermentación. La temperatura media anual es de 10 a 14 °C y la precipitación media anual es de 500 a 600 mm por lo que por ser una zona frutícola de importancia a nivel nacional, favorecida por sus condiciones climáticas, y con las dificultades para el procesamiento de la producción frutícola debido a las mismas temperaturas.

OBJETIVO

Obtener una levadura nativa extraída de la manzana de Cd. Cuauhtémoc, adaptada a las temperaturas de la región para realizar diferentes procesos como la panificación y la elaboración de vinos, tomando en cuenta los factores: costo y características sensoriales que impacten en la calidad de los productos.

Objetivos específicos

- a) Aislar la levadura nativa extraída de la manzana de la región mediante caldos fermentativos.
- b) Identificar las levaduras nativas mediante tinción y cultivo en medios específicos.
- c) Determinar y clasificar las propiedades bioquímicas de la cepa de la levadura nativa de la manzana.
- d) Caracterización molecular de la cepa.
- E) Evaluar la capacidad de la cepa como principal generador de propiedades organolépticas en productos de panificación y vinos.

PARTE EXPERIMENTAL

Para desarrollar el proyecto, y llevar a cabo el aislamiento de la levadura nativa de la manzana se llevaron a cabo las siguientes etapas, las cuales se engloban en la Figura 1, y posteriormente son descritas.



Figura 1. Metodología aplicada para la investigación.

Etapa 1. Proceso Fermentativo. De la región de Cuauhtémoc Chihuahua México se llevó a cabo un muestreo de diferentes huertos de Manzana Golden delicious, siendo el fruto con mayor explotación en la región. Se preparó un caldo fermentativo con las manzanas, sacarosa y agua, brindando a través de este medio las condiciones óptimas para la reproducción efectiva del microorganismo que se busca. Posterior a ello se permitió que fermentara durante una semana con la finalidad de que hubiera la presencia de alcohol, obteniendo una sepa mejor adaptada que superara en número a cualquier otra sepa presente.

Etapa 2. Cultivo. Con la ayuda de medios de transporte estériles se tomaron muestra de 10 ml del líquido del fermento y 10 gramos de los sólidos suspendidos en el caldo fermentativo. Se realiza una técnica de estriado en medio sólido en placa por un periodo de incubación establecido de 24 horas, con la intención de captar el mayor número de microorganismos posibles.

Etapa 3. Aislamiento. Se aislaron las colonias de microorganismos con mayor predominio, posteriormente se realizó un segundo cultivo en agar papa dextrosa, con un tiempo de incubación de 24 horas para el desarrollo de los microorganismos, este proceso se repitió 3 veces hasta obtener un cultivo axénico.

Etapa 4. Identificación microscópica. Para iniciar con la identificación de las colonias que se hayan obtenido en el paso anterior se lleva a cabo la resiembra en medios especializados para la reproducción de hongos y levaduras. Así como tinción de Gram.

Etapa 5. Pruebas Físicas. Se realizaron pruebas de resistencia al pH, y actividad a diferentes temperaturas, color, forma, características de la colonia de la levadura.

Etapa 6. Pruebas Químicas En esta etapa se realizaron pruebas para identificación del metabolismo del microorganismo aislado, pruebas de fermentación en sacarosa, fructosa, maltosa, glucosa y dextrosa, adaptabilidad a medios.

Etapa 7. Implementación en procesos alimenticios. Se realizó la prueba de conteo de hongos y levaduras para obtener unidades formadoras de colonias y estandarizar la cepa, comparando en número de microorganismos con las levaduras de origen comercial. Se lleva a cabo la aplicación de la levadura en diferentes procesos como la vinificación y panificación, utilizando 500 mil unidades formadoras de colonias (UFC) y llevando a cabo el inóculo a temperatura ambiente.

Para llevar a cabo el proceso alimenticio de vinificación, se inocularon 10 litros de jugo de manzana pasteurizado con 500 mil UFC y se sometió a temperatura de refrigeración 4-5°C.

RESULTADOS

El proceso fermentativo inicial con las condiciones extrínsecas adecuadas, fue bastante favorable ya que el sustrato asignado fue bien aceptado por nuestra cepa nativa, gracias a las condiciones metabólicas que presenta, por lo tanto nuestro caldo iniciador resulto positivo a una alta carga bacteriana. Se prolongó el proceso fermentativo hasta obtener como resultado una fermentación alcohólica con la intención de que el medio con el cambio ocurrido, eliminara al microorganismo no resistente y que solo proliferaran los adaptados a las características resultantes de la modificación, ocurrida gracias al metabolismo como cambios en pH, disponibilidad de oxígeno y sustratos resultantes es decir todos los factores intrínsecos modificados.

En relación al método cualitativo por estría en medio solido en este punto agar estándar, empleado para la obtención de un cultivo axénico los resultados fueron favorables, ya que se logró separar a la cepa más resistente y de mayor numero de colonias presentes por medio de su morfología, asegurándonos de su pureza con constantes resiembras ya en un agar específico para hongos y levaduras como lo es el papa dextrosa. Ya con nuestro cultivo axénico proseguimos con una técnica cuantitativa para obtener resultados en UFC y así poder comparar el poder fermentativo de la levadura nativa aplicada a diferentes procesos industriales como la panificación y vinificación en relación con diferentes marcas de levaduras comerciales a diferentes temperaturas.

Tabla 1. Tabla comparativa de resultados

MUESTRA	VOLUMEN ORIGINAL	VOLUMEN DE LA MASA LEUDADA A TEMPERATURA DE REFRIGERACION 5-7 °C/Hrs	VOLUMEN DE LA MASA LEUDADA A TEMPERATURA AMBIENTE 30 °C/Hrs
Levadura Comercial #1	500 cm ³	520 cm ³	700 cm ³
Levadura Comercial # 2	500 cm ³	510 cm ³	700 cm ³
Levadura Nativa	500 cm ³	550 cm ³	600 cm ³

En relación a lo obtenido en la tabla anterior de manera satisfactoria se observó que la levadura nativa con la cual se trabajó se obtiene resultados óptimos para la aplicación en la industria alimentaria en cuanto a procesos fermentativos así como también de acuerdo a las evaluaciones sensoriales y organolépticas que se obtuvieron en los dos ámbitos anteriormente mencionados.

CONCLUSIONES

Fue posible llevar a cabo el aislamiento de levaduras nativas de la manzana chihuahuense a través de procesos fermentativos. Es posible llevar a cabo la identificación de las levaduras obtenidas partiendo de tinciones y medios de cultivo selectivos. De acuerdo a las investigaciones realizadas con anterioridad, es posible identificar que dadas las condiciones bioquímicas del metabolismo de las levaduras, fue obtenida una levadura que lleva a cabo procesos fermentativos de glucosa, sacarosa y dextrosa, demostrando así que puede ser aplicada en procesos fermentativos industriales. A la fecha de la publicación del presente artículo, la investigación se encuentra en etapa de caracterización molecular la cepa aislada.

Se llevó a cabo el procesamiento de productos de panificación y producción de etanol, siendo comparada con levaduras comerciales generando la capacidad de la cepa para producir características organolépticas en los productos finales.

Partiendo de que en la Cd. de Cuauhtémoc en el estado de Chihuahua, de un volumen de producción promedio de 360, 220 toneladas anuales, se estima que 70 % de la producción de manzana se destina al mercado fresco y 30% al mercado industrial para su beneficio y transformación, lo anterior de acuerdo a información proporcionada por la Unión de Fruticultores UNIFRUT, el proyecto de aislamiento y aplicación de levaduras en procesos alimentarios, favorecerá a las industrias procesadoras de esta manzana considerada como de desecho, ampliando la posibilidad de establecer aquellas empresas que no han sido afianzadas por las condiciones climáticas de la región, ya que la cadena de frio garantiza un adecuado proceso de fermentación con las levaduras aisladas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez, R. I. (2005). Levaduras vínicas. Revista de enología científica y profesional, 36. ASISTENCIA, L. N. (1978). Método de conteo de hongos y levaduras en alimentos. NMX-F-255-1978.
2. Bedriñana, R. P. (2011). Selección de levaduras para la elaboración de sidras naturales espumosas por el método tradicional. Valencia.
3. Bisson, L. F. Stuck and Sluggish Fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, v. 50, n. 1, p.107- 119, 1999.
4. Cuéntame INEGI. (1 de Marzo de 2016). Obtenido de Información por entidad: www.cuentame.inegi.org.mx Municipio de Cuauhtémoc. (04 de Marzo de 2017). Obtenido de Municipio de Cuauhtémoc: www.municipiocuauhtemoc.gob.mx
5. Escalante-Minakata, I.-J. (2007). Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas. Biotecnología, disponible en https://arxiv.org/PS_cache-q-bio/pdf/0609/0609049.pdf
6. Fondevilla, D. j. (2006). Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, Editorial de la Universidad de Granada, ISBN-84-338-3821-0
7. Geografía, I. N. (12 de Febrero de 2015). Geografía. Obtenido de www.inegi.gob.mx
8. González, I. V. (2009). Aislamiento e Identificación de Genes de *Saccharomyces Cerevisiar* Implicados en la Tolerancia a Frío. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
9. Guerrero Víctor, M. G. (2004). Identificación de levaduras epifitas obtenidas de manzana. Revista mexicana de Fitopatología, 223-230.
10. Marrero, J. G. (2006). Efecto Invitro de *Saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana. Revista cubana de Ciencia Agrícola, 329-337.
11. Plan Nacional Agrícola 2017-2030, SAGARPA, www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256430/B_sico-Manzana.pdf

CAPACIDAD ANTIRADICAL DE UN NÉCTAR CON LACTOSUERO Y CONCENTRADO DE ARÁNDANO (*Vaccinium Corymbosum*)

Virginia Villa-Cruz¹, Irais Eunice Ramírez González¹, Fernando Daniel Rosas Reyes¹ y Gilber Vela Gutiérrez².

¹Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara, Av. Enrique Díaz de León 1144, Col. Paseos de la Montaña, 47460, Lagos de Moreno, Jalisco y ²Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. México, vivicdidi@gmail.com

RESUMEN

El arándano (*Vaccinium corymbosum*) tiene una demanda a nivel mundial por los diversos beneficios que brinda a la salud debido al alto contenido de antioxidantes. Los antioxidantes intervienen en la protección de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos contra el proceso oxidativo iniciado por radicales libres¹. Por otra parte, las industrias generan subproductos que en algunos casos son considerados desechos. La industria láctea es una de ellas, genera lactosuero como subproducto el cual es importante debido a su composición nutricional ya que presenta un elevado contenido de proteínas (lactoalbúminas y lactoglobulinas), lactosa, minerales y vitaminas. Lagos de Moreno, considerada una cuenta lechera generan millones de litros de lactosuero que afectan al medio ambiente, ya que una gran cantidad es vertida en cañerías sin tratamiento previo.

Es por lo que en este trabajo se elaboró un néctar con concentrado de pulpa de arándano y lactosuero. Se realizaron análisis de actividad antiradical por el método ABTS (mide la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra para reducir el radical catión ABTS^{•+}, en comparación con cantidades estándar de Trolox²). Los resultados indican que la pulpa de arándano tiene capacidad antiradical superior al estándar Trolox, por otra parte, la actividad antiradical del néctar es similar al estándar Trolox.

En la industria alimentaria se producen una amplia variedad de bebidas de tipo refrescantes, fermentadas, carbonatadas, entre otras, además, actualmente se busca agregar un “plus” como en este caso poder antioxidante, lo cual genera una mayor perspectiva de compra y consumo. Lo que significa que el néctar que se elaboró tiene un valor agregado en comparación con otros néctares debido a su actividad antiradical que le otorga el concentrado de pulpa de arándano. La actividad antioxidante presente en el néctar genera una mayor perspectiva de compra y consumo.

INTRODUCCIÓN

Las industrias generan subproductos que en algunos casos son considerados desechos y por lo mismo no son reutilizados, sin embargo, en la actualidad se ha observado que desechos industriales presentan una composición con características que los hacen fuertes candidatos a ser procesados. La industria láctea, es una de ellas, esta industria genera subproductos derivados principalmente del queso, yogurt y crema. Uno de los subproductos de mayor importancia en cantidad y composición es el lactosuero o suero de leche. El lactosuero contiene diversos nutrientes y proteínas que son beneficiosas para la salud, además de ser utilizadas por la industria alimentaria para mejorar la textura, realzar sabores o para realizar aislados de proteínas y comercializarlos.

En la industria de los alimentos se producen una amplia variedad de bebidas, entre ellas bebidas que contengan un “plus” como bajo contenido de sodio y grasa o con características de antioxidante, que genera una mayor perspectiva de compra y consumo por el humano. De estas bebidas, las que contienen antioxidantes, día a día cobran mayor interés en la población. Por lo que, se abre una gran oportunidad en el desarrollo e investigación de nuevos productos, así como desarrollo de tecnologías, que generen y aprovechen antioxidantes. Una opción viable para desarrollar nuevas bebidas son las que se elaboran con Lactosuero.

Según la Norma Oficial Mexicana el suero de leche se define como: “La parte líquida de la leche que se obtiene después de la separación de la cuajada durante la elaboración del queso y/o caseína. Su composición varía en función de la leche utilizada, el tipo de queso del cual proviene, del método de coagulación y de los procesos a los que es sometido para obtener propiedades funcionales específicas (NMX-F-721-COFOCALEC-2012)³”. Con base en lo anterior podemos decir que el lactosuero es un subproducto lácteo obtenido durante la precipitación de las caseínas en la elaboración de quesos. La producción de 1 kg de queso partiendo de 10 litros de leche genera

aproximadamente de 8-9 litros de lactosuero⁴ esto nos indica que se genera una enorme cantidad de lactosuero durante el proceso, el cual, no es aprovechado en su totalidad. Una pequeña parte es usada tradicionalmente como alimento para cerdos, mientras que el volumen restante es desechado en el drenaje público sin ningún tipo de tratamiento previo o es arrojado directamente al medio ambiente, esto representa una pérdida de una fuente de alimentación y además causa problemas de contaminación.

Basados en la composición del lactosuero, se han desarrollado varios productos como la obtención de etanol, ácidos orgánicos, bebidas no alcohólicas, bebidas fermentadas, biomasa, concentrados, aislados e hidrolizados de proteína, películas comestibles, medio de soporte para encapsular sustancias, producción de xantana, enzimas, separación de la lactosa para fines endulzantes en alimentos entre otras aplicaciones⁵. Específicamente, para la industria alimentaria, el lactosuero constituye una fuente económica de proteínas que otorga múltiples propiedades en una amplia gama de alimentos.

Actualmente, en el desarrollo de bebidas, se busca cumplir las expectativas del consumidor relacionado al consumo de productos naturales, en especial aquellos que aportan nutrientes derivado de frutas.

Hay diversos estudios^{6,7,8,9} que muestran que el consumo de frutas y verduras es benéfico para la salud en población de todas las edades ya que protegen contra el desarrollo de enfermedades debido a las propiedades derivadas de su composición de diversos nutrientes tales como vitaminas, minerales y fibra. Algunos de los efectos protectores de las frutas son atribuidos tanto a su contenido nutricional como a la presencia de fitoquímicos que actúan como antioxidantes ya que son capaces de prevenir o ralentizar los procesos oxidativos que intervienen en las enfermedades, como es el caso de las vitaminas A, C y E^{10, 11}. Algunas frutas con capacidad antioxidante son las llamadas "berries". Dentro de este grupo se encuentra la frambuesa, zarzamora, arándano, fresa, mora y grosella, siendo el arándano el que despierta mayor interés debido a su alto contenido en antioxidantes.

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum*), fruta de tamaño promedio de 1cm de diámetro, que presenta una coloración azul morado a negra, es una baya comestible con pulpa dulce y jugosa, se caracteriza por poseer un bajo valor calórico y un gran contenido en agua (figura 1).

Cabe mencionar, que el arándano presenta una fuerte actividad antioxidante debido a distintos fitoquímicos, capaces de prevenir o ralentizar los procesos oxidativos que intervienen en numerosas patologías. Los fitoquímicos presentes y los principales responsables de la actividad antioxidante son los compuestos fenólicos, además es una de las mejores fuentes de fenoles como: ácidos fenólicos, flavonoles, antocianinas y proantocianidinas. El fruto también contiene principalmente antocianinas, que son pigmentos naturales los cuales son los responsables de su característico color azul^{11, 12, 13}. Se ha reportado que el consumo de arándano contribuye a una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, inhibe el crecimiento de células cancerosas, así como prevenir enfermedades neurodegenerativas¹⁴.



Figura 1.- Arándano azul

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de lactosuero y arándano

El lactosuero se obtiene de por lo menos 17 queserías ubicadas en Lagos de Moreno, Jalisco. El arándano se compró y es utilizado fresco.

Tratamiento del lactosuero

El lactosuero se filtra para eliminar sólidos, después, se centrifuga a 5000 rpm a a 4°C por 10 minutos para la eliminación de grasa. Se mantiene a 4°C para su utilización.

Preparación del concentrado de arándano

Para la elaboración del néctar, se prepara un concentrado de pulpa de arándano fresco. El arándano fresco se selecciona, descartando aquellos que se encuentran en mal estado, posteriormente se lava y es desinfectado. Después es sometido a escaldado por un minuto en agua a 90°C, a continuación, el arándano se procesa en el extractor Taurus Vitale para obtener su pulpa, por último, la pulpa se concentra 2 veces su volumen a fuego bajo durante aproximadamente 5 minutos.

Formulación del néctar

Para la elaboración del néctar, se toma como base la formulación de una bebida propuesta por Williams Mena (2002)¹⁵, respetando el 50% en contenido de lactosuero y haciendo variaciones en el contenido de concentrado, agua y azúcar tomando en cuenta los valores indicados en la norma general del CODEX para jugos (zumos) y néctares de frutas para cumplir con ella. El néctar formulado se envasa en un recipiente de vidrio de volumen 240 ml y se somete a una pasteurización (30 minutos a 65°C).

Análisis realizados

Se realizan análisis de grasa (NMX-F-387-1982)¹⁶, sólidos totales, sólidos disueltos (NMX-F-527-1992)¹⁷, ceniza (NMX-F-066-S-1978)¹⁸, proteína (NMX-F-068-S-1980)¹⁹, pH (NMX-F-317-S-1978)²⁰, acidez (NMX-F-511-1988)²¹, °Brix (NMX-F-103-1982)²² y capacidad antiradical por el método ABTS. Este método consiste en la generación del radical ABTS^{•+}, por la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio para producir un cromóforo azul verdoso con absorciones máximas a longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm²³. La técnica mide la capacidad de los antioxidantes presentes en la muestra para reducir el radical catión ABTS^{•+}, en comparación con cantidades estándar de Trolox²⁴.

RESULTADOS

Se obtuvo un néctar el cual se envasó en recipientes de vidrio de 240 ml según lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994 (figura 2).



Figura 2.- Néctar elaborado

Los resultados de los análisis proximales, pH, acidez y °Brix se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Resultados de análisis de lactosuero y néctar

Análisis	Lactosuero	Néctar
pH	4.3 ± 0.0001	4 ± 0.00003
Acidez (%)	2.20 ± 0.00	0.3± 0.000003
°Brix	5.5 ± 0.020	17± 0.08300
Grasa (%)	0.1 ± 0.00	0.1± 0.0000
Sólidos totales (mg/l)	0.05 ± 0.00	0.19 ± 0.430
Sólidos disueltos (mg/l)	0.04 ± 0.00	0.19 ± 0.210
Ceniza (%)	6.4 ± 0.00	5.1± 0.000
Proteína (%)	1.08 ± 0.009	0.7 ± 0.027

Como se puede apreciar en la tabla, una de las principales diferencias entre el lactosuero y el néctar es el pH acidez y °Brix, estos valores se ajustaron en el néctar debido a que el CODEX nos pide un pH de entre 3-4, una acidez entre 0.2-0.6% y los °Brix deben de ser mayor a 15 para éste tipo de bebida.

Para la capacidad antirradical se procesaron dos muestras, una de pulpa de arándano y otra del néctar, los resultados se muestran en la figura 3 y 4 respectivamente. Las muestras se presentan con la respectiva comparación de estándar Trolox para su mayor comprensión.

Como se aprecia en la figura 3, la curva del porcentaje de inhibición empieza con 86% en 15µg y se mantiene cerca del 100% en las concentraciones de 30µg, 45µg y 60 µg, hasta que llega a 75 µg y presenta una caída en su inhibición respecto a 60 µg. Al realizar la comparación con el estándar

Trolox podemos apreciar que el porcentaje de inhibición de la pulpa es mayor esto indica que la pulpa de arándano tiene una importante actividad antiradical, mayor que el estándar.

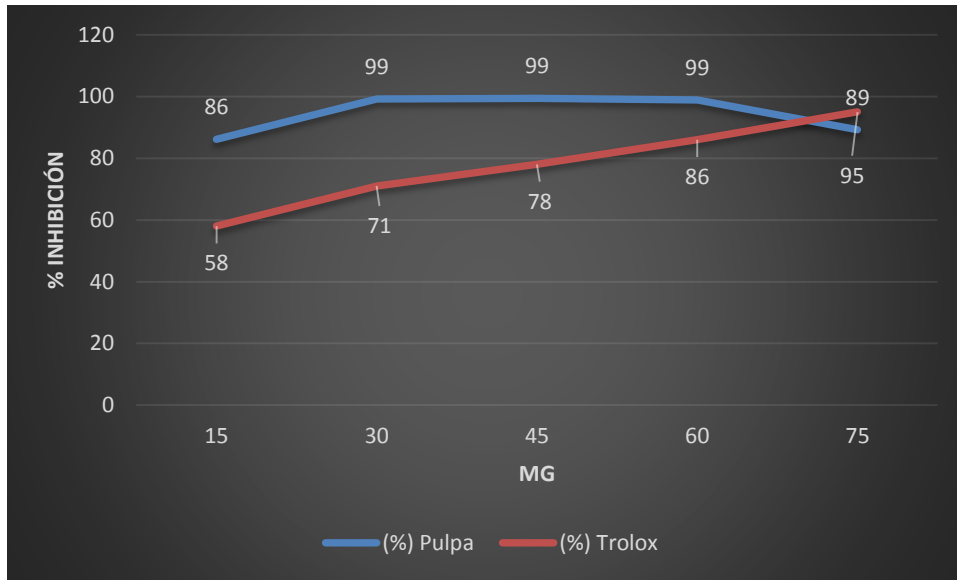


Figura 3.- Comparación entre porcentaje de inhibición de pulpa y trolox

La figura 4, muestra los valores de absorbancia (ABS) del néctar los cuales tienen un comportamiento ascendente, sus valores abarcan desde 48% a 98% de ABS, en comparación con la pulpa mantienen un máximo de ABS muy similar.

El porcentaje de inhibición del trolox y del néctar reflejan un comportamiento similar.

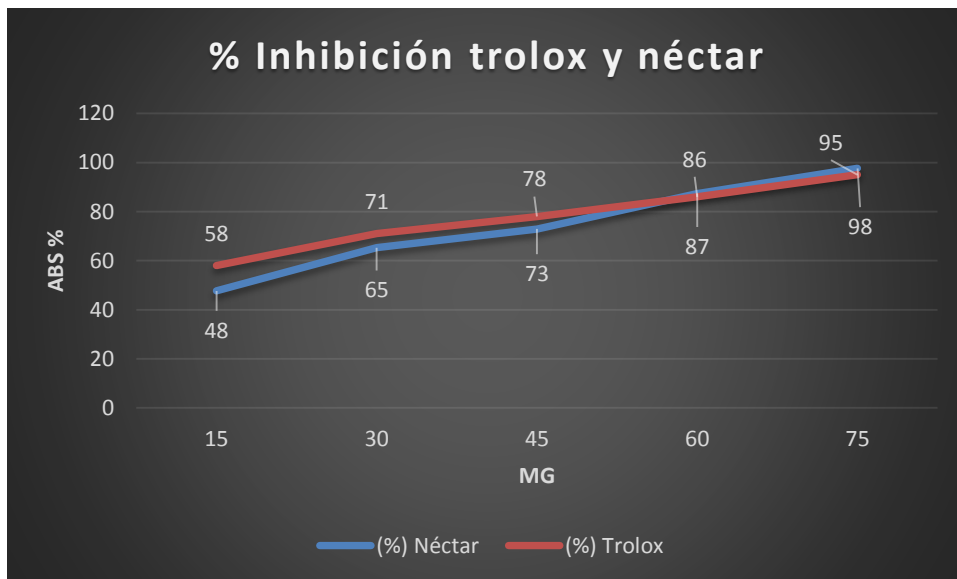


Figura 4.- Comparación porcentaje de inhibición de trolox y néctar.

CONCLUSIONES

Es posible elaborar un néctar con lactosuero y pulpa de arándano, el cual tiene un valor agregado en comparación con otras bebidas debido a su actividad antioxidante que le otorga la pulpa de arándano (*Vaccinium corymbosum*).

Además, al incrementar la cantidad de pulpa de arándano se incrementa la actividad antioxidante, sin embargo, la actividad antioxidante del néctar es menor que el extracto de pulpa, pero el lactosuero por sí sólo no contiene una importante actividad antioxidante ya que según Virtanen y colaboradores (2007)²⁵ sólo unos pocos péptidos antioxidantes han sido identificados en productos lácteos fermentados. La tendencia del porcentaje de inhibición de trolox es similar al comportamiento del estándar, lo cual nos indica que la bebida presenta antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fabiani G., Pérez E. E., Corral L., Salguero A., González M., Tereschuk M. L., Boggetti H. 2013. Evaluación del contenido de antioxidantes en extractos convencionales y supercátricos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)
2. García A. J., Periago M. J., Vidal M. L., Cantos E., 2002. Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas. An. Vet. 18., 103-114.
3. NMX-F-721-COFOCALEC-2012, Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos- suero de leche (líquido o en polvo) – Especificaciones y métodos de prueba.
4. Galdámez Gutiérrez K., Gamboa Coronel M., Márquez Montes R., Ballinas Gómez M. N., López Zúñiga E. j., Vela Gutiérrez G. 2009. Elaboración y evaluación sensorial de galletas enriquecidas con harina de lactosuero. Rev. Ciencias UNICACH. 3. 23-28.
5. Parra R. A., 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Rev. Fac. Nal.Agr.Medellín. 61, 4967-4982.
6. Gil A, Martínez de Victoria E, Olza J.2015 Indicators for the evaluation of diet quality. Nutr Hosp. 31(3):128-44.
7. Arribas H, Battistini T, Rodríguez M, Ortiz A. 2015 Asociación entre obesidad y consumo de frutas y verduras: un estudio de base poblacional en Perú. Rev. chil. Nutr. 42(3): 241-7. 2015.
8. Ben Q, Zhong J, Liu J, Wang L, Sun, and Yuan Y. 2015. Association Between Consumption of Fruits and Vegetables and Risk of Colorectal Adenoma: A PRISMA-Compliant MetaAnalysis of Observational Studies. Medicine 94(42): p. 1- 12.
9. Araya L, Clavijo R, Herrera C. 2006. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. ALAN 56 (4), 361-5.
10. Morillas J., Delgado J. 2012. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. Revista nutrición clínica y dietética hospitalaria 32 (2): 8-20.
11. Vázquez-Castilla, S., Guillén-Bejarano, R., Jaramillo-Carmona, S., Jiménez-Araujo, A., & Rodríguez-Arcos, R. (2012). Funcionalidad de distintas variedades de arándanos.
12. Sellappan, S., Akoh, C.C., Krewer, G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. J. Agric. Food Chem., 50, 2432-2438.
13. Wang, S.Y.; Jiao, H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen. J. Agric. Food Chem. 48, 5677-5684.
14. Aldaba Márquez Janet, Concha Herrera V., Enciso Muñoz V. C., Carranza Concha J. 2016. Funcionalidad del arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.). Inv. Des. En Cien. Y Tec. De Al. Vol. 1. 423-428.
15. Williams Mena P., 2002. Formulación y elaboración de dos bebidas refrescantes con base en suero dulce de queso fresco y sabores de frutas. Tesis presentada como requisito parcial para optar por título de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de licenciatura. Zamorano Carrera de Agroindustria, Zamorano, Honduras. 18-20.
16. NMX-F-387-1982, Alimentos. Leche Fluida Determinación de grasa butírica por el método de Gerber.
17. NMX-F-527-1992, Alimentos. Determinación de sólidos totales, sólidos disueltos y sólidos en suspensión en agua.

18. NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos.
19. NMX-F-68-S-1980. Alimentos. Determinación de proteínas.
20. NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos.
21. NMX-F-511-1988. Alimentos. Determinación de acidez en leche reconstituida.
22. NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y Derivados. Determinación de Grados Brix.
23. Restrepo D. C., Narváez C. E., Restrepo L. P., 2009. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Quim. Nova.*, 32., 1517-1522.
24. García A. J., Periago M. J., Vidal M. L., Cantos E., 2002. Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas. *An. Vet.* 18., 103-114.
25. Virtanen T, Pihlanto A, Akkanen S, Korhonen H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*;102: 106-15.

CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA Y MICROBIOLÓGICA DE HARINA DE VAINA DE MEZQUITE COLECTADA EN PÉNJAMO, GUANAJUATO.

Francisco Javier Hinojosa Alonso; Eva Marcela Licea De Anda; Teresa Susana Herrera Flores; Alda Alejandra Arratia Casto; María Guadalupe Moreno Contreras*

Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica de Pénjamo,

*Autor de correspondencia: gmoreno@uppenjamo.edu.mx

RESUMEN

Actualmente, para que un alimento sea considerado saludable se debe caracterizar respecto a los nutrientes que contiene y a los beneficios que aporta a la salud. Además, se deben considerar las propiedades que posibilitan la formulación de diversos productos. El mezquite es un árbol que desde épocas remotas ha constituido un recurso valioso para los habitantes de zonas áridas y semiáridas de México, ya que todas las partes del árbol son susceptibles de ser utilizadas. Sin embargo, su uso principal es para leña, mientras que las vainas están subaprovechadas. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la harina de dos tipos de vaina de mezquite (*Prosopis laevigata*) como posible materia prima para la formulación de productos de valor agregado. La colecta de las vainas se realizó en el municipio de Pénjamo, Gto., clasificándolas por color en vainas amarillas y vainas moradas. Se realizaron pruebas bromatológicas y microbiológicas, resultando libres de microorganismos. El contenido de ácidos grasos en vainas amarillas y moradas fue de 1.6 y 1.7% respectivamente. La proteína total fue de 12.4% para vainas amarillas y de 11.3% en vainas moradas. En cuanto a fibra cruda, el mayor contenido se tuvo en las vainas moradas con 21.3%, mientras que las vainas amarillas poseen 18.4%. En relación al contenido de azúcares, las vainas amarillas tuvieron un contenido más elevado (20.5%) que las moradas (19.3%). De acuerdo a los resultados, la harina de la vaina de mezquite puede constituir una fuente de proteína, azúcares y fibra para la dieta humana. La caracterización sienta un precedente para la continuación de investigaciones que ayuden a la sociedad a encontrar materias primas alternativas, las cuales puedan ser aprovechadas de forma sustentable para el desarrollo de productos de valor agregado.

INTRODUCCIÓN

En la última década del siglo XX comenzaron a desarrollarse nuevos conceptos en nutrición, como resultado de nuevos estilos de vida y la preocupación por elevar la calidad de vida de los individuos. La Academia Nacional de Ciencia de los Estados Unidos ha definido los alimentos funcionales como cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado, que pueda proporcionar un beneficio a la salud superior al de los nutrientes tradicionales que contiene. Los alimentos funcionales ejercen su actividad en múltiples sistemas, especialmente el gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico [1]. El consumidor busca la innovación en los productos, destacándose por aquellos que le aporten un beneficio a la salud; así lo demostró el estudio llevado a cabo por The Boston Consulting. En los Estados Unidos los productos envasados han crecido significativamente en el 2015, principalmente las pequeñas y medianas empresas dedicadas a la comercialización de productos saludables, alimentos y bebidas ricas en proteínas. Por lo tanto, existen grandes oportunidades de desarrollar snacks y bebidas saludables [2].

El mezquite es una planta leguminosa originaria de México y elemento característico de las zonas áridas de Norte América, aunque su distribución se ha extendido hasta algunas regiones áridas y semiáridas de Centro y Sudamérica. En México, el género *Prosopis* es abundante en los estados del norte y centro, así como en las planicies costeras en donde se establece en condiciones áridas y semiáridas. De las 11 especies presentes en el país, *P. laevigata* es la de mayor distribución geográfica [3-5]. Debe señalarse que esta cobertura no es continua y en varios casos está fragmentada por cordones montañosos. No ha sido posible asociar parte de su variación exomorfológica a un área geográfica determinada, por esta razón se acepta que se trata de una sola especie [3]. Diferentes estudios han permitido comprender la gran utilidad ambiental de esta especie, no tan solo por sus usos, sino también por su papel dentro de las regiones áridas, dado que es un excelente controlador de la erosión; como otras leguminosas, tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico al suelo mejorando su fertilidad y proporciona alimento y refugio a la fauna silvestre [6].

El mezquite es una planta que desde la antigüedad constituyó una fuente de obtención de diversos productos para los pobladores de las zonas áridas de Norte América. En la actualidad se siguen obteniendo algunos beneficios, pero en escala reducida. Por ejemplo, en el estado de Guanajuato se utiliza para la fabricación de hormas para calzado y sigue siendo un recurso de importancia para los pobladores de la región, quienes llevan a cabo su aprovechamiento como una actividad complementaria a la agricultura, la ganadería y la explotación de otras especies silvícolas [2-6].

En Guanajuato, el aprovechamiento irracional de la especie ha derivado en una disminución de la misma, por lo que diversas organizaciones han fomentado la reforestación de las regiones afectadas. Para que esta acción tenga eco en la población, se debe acompañar de un impacto socioeconómico a través del aprovechamiento sustentable de la especie. Para lograrlo es necesario el desarrollo de productos de valor agregado que motiven a la población a conservar y propagar el árbol de mezquite a través de un ingreso generado por la comercialización del fruto; para que la estrategia sea factible a largo plazo, los productos desarrollados deben representar una opción de consumo competitiva [7].

En México, al igual que en diversos países de América, las vainas de mezquite son aprovechadas en la alimentación humana: se consumen en forma de fruta fresca, fruta conservada en su propio jugo dulce, pinole de mezquite, queso de mezquite, piloncillo, atole, harinas o como bebidas fermentadas [8], existiendo ya reportes de su incorporación en la elaboración de diversos productos alimenticios [1,8,9]

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la harina de dos tipos de vaina de mezquite (*P. laevigata*) colectadas en el municipio de Pénjamo, Guanajuato, como posible materia prima para el desarrollo de productos de valor agregado que propicien el aprovechamiento sustentable de la biodiversidad del bajío guanajuatense.

PARTE EXPERIMENTAL

Material Vegetal

El material vegetal (vainas de mezquite) se colectó en el municipio de Pénjamo, Guanajuato, en la comunidad de El Sauz de Villaseñor. El criterio de separación de las vainas fue por el color, acorde a la madurez [10] (Figura 1). Se seleccionaron las que estuvieran libres de plagas y daño mecánico. La longitud de las vainas fue de 16.0 ± 1.8 cm, con un ancho de 1.0 ± 0.1 cm y 17 ± 2 semillas/vaina en promedio.

Procesamiento de la muestra

Previo a la obtención de la harina, se realizó una desinfección de las vainas con cloro comercial a 50 ppm por 5 minutos, se enjuagaron con agua y se secaron en un horno de convección Modelo FE 30 (Felisa, México) a 65 °C durante 4 horas, tras lo cual se realizó una molienda en un molino pulverizador (Pulvex, México), y la muestra fue tamizada a través de una malla No.40 (abertura 420 micrones) para la obtención de harina fina.



Figura 1. Material vegetal empleado: Vainas de Mezquite Amarillas (A), Harina de Vainas Amarillas de Mezquite (B), Vainas de Mezquite Moradas (C), Harinas de Vainas Moradas de Mezquite (D).

Análisis bromatológicos y microbiológicos

La determinación de ácidos grasos, cenizas y azúcares totales se evaluó mediante la metodología descrita previamente para harina de leguminosa [11]. La harina de los dos tipos de vaina se desengrasó con en equipo Soxhlet a 67°C por seis horas; la separación de los ácidos grasos con el hexano se hizo en un rotavapor, a 47°C, y el resto del solvente se evaporó en una estufa de circulación de aire forzado, a 60°C por 24 horas. Finalmente se determinó el contenido de ácidos grasos con la fórmula: % Ac. Grasos= (Peso ácidos grasos/peso muestra) *(100).

La cuantificación de cenizas se obtuvo al someter la harina a 550°C durante 4 horas en una mufla, se dejó enfriar por 12 horas y se procedió a la obtención de cenizas con la fórmula: % Cenizas= (Pce/Pmf)*100, donde Pce: Peso de cenizas y; Pmf: Peso de muestra fresca [11].

La determinación de azúcares solubles totales se hizo por el método de Antrona, con 5 g de harina sin desengrasar y 100 mL de etanol al 80%. Enseguida recibieron calor hasta ebullición a 80°C por 10 minutos, y luego un filtrado con papel filtro poro medio; la harina retenida en el papel filtro se colocó en el Soxhlet con 100 mL más de etanol al 80% y puesto a ebullición durante 2.5 horas. El etanol se evaporó en baño maría entre 95 y 100°C para concentrar las muestras a 10 mL. Finalmente se aforó a 25 mL con agua destilada; la concentración de la muestra fue de 0.2 g/mL. Se preparó una solución stock de Glucosa a una concentración de 2.5 mg/mL, para la curva de calibración; se tomaron 300µL del stock de glucosa o de las muestras para realizar la reacción con la solución de ácido sulfúrico + antrona (0.2 g antrona/100 mL H₂SO₄ 75%), las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm [11].

La determinación de proteína cruda y fibra cruda se realizaron de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC [12]. La proteína cruda se determinó empleando un equipo digestor y destilador Micro Kjeldahl [Buchi, Suiza], para obtener el contenido de proteína se usó el factor de conversión 6.25. Para la fibra cruda se siguió el método AOAC Ba 6a-05 utilizando un analizador de fibra FIWE (Velp, Italia). La cuantificación de humedad se realizó mediante el método rápido de la termobalanza [13], empleando un analizador de humedad con radiación infrarroja (lámpara halógena) (OHAUS, USA).

A las muestras de harina se les realizó también el análisis microbiológico para determinación de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y hongos y levaduras, de acuerdo a la normativa vigente NOM-092-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, NOM-111-SSA1-1994 [14-16].

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado; el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y las pruebas de comparación de medias de Tukey (valor de alfa <0.05) se realizaron empleando el software Minitab 18 (Minitab, USA).

RESULTADOS

Se realizó el análisis bromatológico y microbiológico de las vainas de mezquite (*P. laevigata*) colectadas en el municipio de Pénjamo. Gto., para determinar si su uso es factible o benéfico y proponer su implementación en la generación de productos de valor agregado. El criterio de separación de las vainas fue considerando 2 estados de madurez definidos por el color de las vainas con referencia a la escala de colores [10]: morada (vaina madura) y amarilla (vaina seca) (Figura 1). Para poder establecer la calidad microbiológica de la harina obtenida de las vainas de mezquite se realizaron pruebas microbiológicas acorde a la normativa vigente [14-16], resultando libres de microorganismos con menos de un coliforme/ bacteria mesófila/hongo o levadura por gramo de harina, tanto para vainas moradas como amarillas.

En cuanto a la caracterización bromatológica (Tabla 1), los valores de cenizas (3.3 %), ácidos grasos (1.5 y 1.7 %) y azúcares totales (20.5 y 19.3 %) fueron estadísticamente igual entre las vainas amarillas y moradas. El contenido de cenizas y ácidos grasos es similar al rango inferior reportado previamente para esta especie (2.7 a 6.5 % para cenizas y 1.5 a 4.0% para grasas) [9, 17,18], lo que podría atribuirse a la fracción de la harina analizada, o bien, a una etapa de maduración más avanzada de la vaina [19].

Tabla 1. Caracterización Bromatológica de la harina de vainas de Mezquite (*P. laevigata*)

Composición (%)	Vainas Amarillas	Vainas Moradas
Humedad	6.5±0.1 A	6.1±0.0 B
Cenizas	3.3±0.1 A	3.3±0.1 A
Ac. Grasos	1.7±0.1 A	1.2±1.0 A
Proteínas	12.3±0.0 A	11.2±0.1 B
Fibra Cruda	18.4 A	21.3 B
Azúcares Totales	20.5±2.8 A	19.3±3.5 A
Carbohidratos*	57.6±0.2 A	56.6±1.0 A

Los valores corresponden a la media ± SD. Dentro de una fila, los datos que no comparten una letra son significativamente diferentes con una confianza del 0.95 (Tukey). *Valor obtenido por diferencia.

Tanto el contenido de azúcares totales (20.5 y 19.3 %) como el de carbohidratos totales (obtenido por diferencia), coincide por lo reportado en harina completa de vainas de *P. laevigata* (Azúcares totales 19.8 y 24.2 % [17] y Carbohidratos 53.9-56.8 % [9]). Es de notar que los valores obtenidos de azúcares totales representan apenas la mitad del contenido total de carbohidratos, lo que puede atribuirse a la complejidad y composición de los polisacáridos de la vaina, principalmente fibra y galactomananos, los cuales son subdeterminados por la técnica empleada [20, 21].

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteína (Tabla 1) observándose un valor de 12.3 % en vainas amarillas, superior al encontrado en vainas moradas de 11.2%; la relación del contenido proteico en vainas amarillas/vainas moradas es inversa y los valores son mayores a los reportados previamente [17], donde obtuvieron valores de 7.9 % para vaina roja y de 7.7 % para vaina blanca. Durante la revisión bibliográfica, se observó una elevada variación en el contenido de proteína cruda, dependiendo principalmente de la fracción de harina analizada, con valores desde 0.5% para la cubierta de la semilla (endocarpio) hasta 30.9% para la harina de semilla (embrión) [18].

El contenido de fibra cruda en las vainas amarillas fue de 18.4%, significativamente menor al de las vainas moradas de 21.3%. Al igual que el contenido proteico, los valores de fibra se ven altamente influenciados por la fracción de la harina, siendo muy elevados en el exocarpo y endocarpio (70% en la cubierta dura del endocarpio) y menores en la semilla (8.3%) y mesocarpo (2.2%) [18]. Los

valores obtenidos en el presente trabajo son similares a otros reportados para harina completa [9] y podrían deberse a la pérdida de fibra por eliminación de las cubiertas duras de la vaina durante el proceso de tamizado para obtener harina fina. Es destacable que dichos valores son notablemente superiores a maíz, arroz o trigo [22].

El valor nutritivo de las leguminosas se debe esencialmente a su contenido proteico; en el caso de la vaina de mezquite se ha reportado un buen balance en su composición de aminoácidos, siendo complementaria, por su contenido de lisina, a la dieta basada en granos de cereales. [9, 18, 23]. El mezquite también es fuente importante de azúcares, que son esenciales para tener energía, siendo la sacarosa el principal azúcar de la pulpa, mientras que de especial importancia es el elevado contenido de galactomananos en la semilla, polisacáridos que pueden actuar como fibra dietética; además, se están usando como aditivos alimenticios actuando como espesantes [20]. A la fibra se le atribuye el papel protector contra el cáncer de colon, debido a la fermentación que realiza la micro flora en el intestino grueso. También se ha estudiado cierta implicación en la disminución de los niveles de colesterol total, cuando la concentración de fibra es mayor se obtienen mejores beneficios [23].

CONCLUSIONES

En la actualidad para que un alimento sea saludable se debe tener en cuenta los nutrientes que contiene y los beneficios que aporta a la salud. Lo que representa una oportunidad para investigar y caracterizar nuevas materias primas que cumplan con estos requerimientos, dentro de esta búsqueda se encuentra la harina de vaina de mezquite (*P. laevigata*).

Según los datos obtenidos en este estudio las vainas de mezquite colectadas presentan características que las convierten en materia prima útil para alimentos enriquecidos y/o funcionales, ya que contiene un nivel significativo de proteínas, fibra y azúcares, constituyendo una alternativa regional para el aprovechamiento de la biodiversidad en la región.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP) a través del Apoyo para el Fortalecimiento de los Cuerpos Académicos Convocatoria 2017. Cuerpo Académico en Formación “Ciencia y Tecnología Sustentable”.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. G. Hernández Ángel, “Evaluación de la incorporación de harina de mezquite (*Prosopis laevigata*) y otras leguminosas haba (*Vicia faba* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en la elaboración de galletas” Tesis de licenciatura Ingeniería en Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2014, 64 pp.
2. N. Vidal “La era saludable: Alimentos funcionales, nutricosmética y nutraceuticos” AINIA Centro tecnológico, España. Disponible en: <http://www.ainia.es/insights/la-era-saludable-alimentos-funcionales-nutricosmetica-y-nutraceuticos/> (Consultada el 29 de abril de 2018) 2015.
3. Comisión Nacional de las Zonas Áridas “Mezquite *Prosopis spp*: Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México” CONAZA: Instituto Nacional de Ecología. México. D.F. 1994, 32 pp.
4. A. Palacios, Ramón A. “Los Mezquites Mexicanos: Biodiversidad y Distribución Geográfica” Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 41(1-2), 2006, 99-121.
5. SIRE: CONABIO-PRONARE. “*Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd, Paquete tecnológico”, Comisión Nacional Forestal. Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/988Prosopis%20laevigata.pdf> (Consultada el 29 de abril de 2018).
6. E. Rodríguez Saucedo, G. Rojo Martínez, B. Ramírez Valverde, R. Martínez Ruiz, R., M. Cong Hermida, S. Medina Torres y H. Piña Ruiz “Análisis Técnico del árbol del Mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd.) en México”, Ra Ximhai, vol. 10, no. 3, 2014, pp. 173-193.

7. G.A. Montes Frausto y M.G. Moreno Contreras, "Distribución y aprovechamiento de especies de Mezquite (*Prosopis spp*) en el municipio de Pénjamo, Guanajuato". Memorias Congreso 10mo° Verano Estatal de Investigación, Secretaria de Innovación, Ciencia y Educación Superior, Gobierno de Guanajuato. 03 de julio al 04 de agosto de 2017, León, Gto. Mex.
8. J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, R. F. González Laredo y M. A. García-Casas. "Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*)" *CyTA - Journal of Food*, 11:2, 2016, pp. 162-170.
9. A. P. Barba La Rosa, J.T. Frías-Hernández, V. Olalde-Portugal y J. González Castañeda, "Processing, nutritional evaluation, and utilization of whole mesquite flour (*Prosopis laevigata*)", *Journal of food science*, 71(4), 2006, pp. S315-S320.
10. A.N. Cerón Ortiz, A. Y. Vidal Gómez y M.A Ángeles Monroy, "Impacto del estado de madurez de la vaina de mezquite (*Prosopis laevigata*) en su composición fisicoquímica posterior a su transformación en polvo" *Revista Congreso Nacional de Ingeniería y Tecnologías para el Desarrollo Sustentable Vol.1*, 2015, pp 1-7. ISSN 2395-9614.
11. T. S. Herrera Flores, A. Delgado Alvarado, P. Ramírez Carrasco, E. M. Licea de Anda, M. G. Moreno Contreras y C. P. Machuca Chávez, "Estudio de la composición proximal de variedades de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) Costa 2004 y Blanoro" *Ciencia y Tecnol. Agropec. México*. Vol. 2. Núm. 2, 2014, pp 9-15.
12. Official Methods of Analysis. A.O.A.C. 15 th Edition. U.S.A. (1990).
13. NMX-F-428-1982. Alimentos. Determinación de humedad (método rápido de la termobalanza) Dirección General de Normas.
14. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Dirección General de Normas.
15. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Dirección General de Normas
16. NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Dirección General de Normas
17. L. Y. Peña-Avelino, J. M. Pinos-Rodríguez, L., Yáñez-Estrada, B. I. Juárez-Flores, R. Mejía, y H. Andrade-Zaldívar "Chemical composition and in vitro degradation of red and white mesquite (*Prosopis laevigata*) pods", *South African Journal of Animal Science*, 44(3), 2014, pp. 298-306.
18. L. Díaz-Batalla, J. P. Hernández-Urbe, A. D. Román-Gutiérrez, R. Cariño-Cortés, J. Castro-Rosas, A. Téllez-Jurado y C. A. Gómez-Aldapa, "Chemical and nutritional characterization of raw and thermal-treated flours of Mesquite (*Prosopis laevigata*) pods and their residual brans", *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 2018, pp. 444-451.
19. M.L. Harden y R. Zolfaghari "Nutritive composition of green and ripe pods of honey mesquite (*Prosopis glandulosa*, Fabaceae)", *Economic Botany*, 42(4), 1988, pp. 522-532.
20. G.E. Cruz Alcedo, "Production and characterisation of *Prosopis* seed galactomannan", (Doctoral dissertation, ETH Zurich). 1999.
21. J. Cerning-Beroard, "A note on sugar determination by the anthrone method." *Cereal Chemistry* vol. 52, 1975, pp. 857-860.
22. L. Dyner, C. Cagnasso, V. Ferreyra, M. L. Pita Martín de Portela, N. Apro y M. Olivera Carrión. "Contenido de calcio, fibra dietaria y fitatos en diversas harinas de cereales, pseudocereales y otros". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, vol. 50, no. 3, 2016, pp. 435-443
23. Y. Aguilera Gutiérrez, "Harinas de Leguminosas Deshidratadas: Caracterización Nutricional y Valoración de sus Propiedades Tecno-Funcionales", Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola. Universidad Autónoma de Madrid. 2009, 273 pp.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES ELABORADAS A PARTIR DEL ALMIDÓN DE MALANGA (*COLOCASIA ESCULENTA*)

Hyllenne Bojorges-Gutiérrez, María Antonieta Ríos-Corripio* y Aleida Selene Hernández-Cazares

Colegio de Postgraduados - Campus Córdoba. Programa de Innovación Agroalimentaria Sustentable. Km. 348 Carretera Federal Córdoba-Veracruz, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, C.P. 94946. *Autor de correspondencia: rios.antonietta@colpos.mx

RESUMEN

Actualmente, los materiales utilizados en el envasado de alimentos son los polímeros derivados del petróleo. Sin embargo, se han identificado problemas asociados a su uso, uno de ellos es la contaminación. El uso de polímeros biodegradables puede contribuir a minimizar el impacto ambiental e incrementar la vida útil en los alimentos. Las películas comestibles son ejemplo de ello, funcionan como barreras selectivas para la transferencia de gases y humedad, además pueden servir como vehículos para un amplio rango de compuestos bioactivos. Malanga (*Colocasia esculenta*) cuenta con un alto contenido de almidón, superior al 80%¹, es un recurso propio de la región de Veracruz que no ha sido aprovechado y que, con el desarrollo de las películas comestibles, se pretende brindarle un valor agregado. El objetivo de este estudio fue caracterizar fisicoquímicamente y estructuralmente las películas de almidón obtenidas a partir de malanga (*Colocasia esculenta*). Se utilizó el método de casting. Los resultados obtenidos mostraron que las películas de almidón presentaban características típicas de películas comestibles hechas a base de otros almidones. El análisis de espectroscopia infrarroja (FTIR) nos ayudó a establecer las características espectrales de las muestras en base a los componentes empleados en su elaboración. Estas películas comestibles a base de almidón de malanga nos proporcionan ventajas en el envasado de los alimentos como: ser biodegradables y de bajo costo en su producción.

Palabras clave: Películas comestibles, almidón, malanga

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los residuos generados por materiales de embalaje a base de petróleo y otros compuestos no renovables, ha provocado un grave problema de contaminación ambiental (Piyada *et al.*, 2013). Esto ha generado el desarrollo de nuevos materiales, que sean biodegradables y utilicen recursos renovables.

Las películas comestibles se definen como una capa delgada de biopolímero (matriz) que es empleada en la superficie de un alimento y puede ser consumida. Actúan como barreras selectivas para la transferencia de humedad, gases y nutrientes; se pretende que eviten o disminuyan la oxidación y la pérdida de compuestos volátiles responsables de olores y sabores específicos en los alimentos (Guilbert *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2009). Uno de los biopolímeros más convenientes para elaborar películas comestibles, es el almidón debido a su alta disponibilidad, por ser renovable y de bajo costo (Savadekar y Mhaske, 2012).

La Malanga (*Colocasia esculenta*) es un tubérculo tropical que pertenece a la familia monocotilidónea *Araceae*. Su componente más importante es el almidón (73-80%) y altamente digestible, aunque también posee cantidades significativas de fibra, minerales y mucílago (Njintang *et al.*, 2008).

Sin embargo, la aplicación de película de almidón está limitada por sus propiedades mecánicas y capacidad de barrera. Sin embargo, plastificantes como el glicerol o sorbitol se han utilizado para mejorar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las películas basadas en almidón (Muscat *et al.*, 2012)

Debido a que el plastificante ayuda a reducir los enlaces intramoleculares que existen en las cadenas de los polímeros, lo que conlleva a una modificación de las propiedades mecánicas y producen películas con mayor flexibilidad (Campos *et al.*, 2011).

El objetivo de esta investigación fue caracterizar fisicoquímicamente y estructuralmente las películas de almidón obtenidas a partir de malanga (*Colocasia esculenta*), con distintos tipos de plastificantes.

MATERIALES Y MÉTODO

Para este estudio se utilizó glicerol proporcionado por Monarca Aditivos (Puebla, México), sorbitol Sigma Aldrich (St. Louis, EE.UU.), los cuales fueron utilizados como plastificantes. Todos los otros reactivos utilizados en este estudio fueron de grado analítico. Para la obtención de almidón se utilizaron rizomas frescos de malanga blanca, procedentes del campo experimental del Colegio de Postgraduados, campus Córdoba.

Obtención de almidón

Se utilizó la metodología descrita por Rapelo *et al.* (2014), la cual consistió en pelar, cortar y moler la malanga para obtener una lechada y después filtrarla en tela (malla 80), con el propósito de eliminar fibra y otras partículas. El filtrado se dejó sedimentar por aproximadamente 4 horas a 4°C, posteriormente el sobrenadante se decantó y la lechada de almidón se lavó tres veces con agua destilada. El último lavado se centrifugó (Centrifuga Power Spin, EE. UU.), con el objetivo de recuperar el sobrenadante. Finalmente, se secó en estufa de convección a 60°C por 24 horas.

Preparación de películas

Las soluciones formadoras de película se prepararon disolviendo lentamente el 1% (p/p) de almidón en agua desionizada a temperatura ambiente. Luego, se elevó la temperatura a 90°C por un lapso de 30 minutos con agitación constante. Se añadió glicerol o sorbitol como plastificante (Cuadro 1), y la solución se agitó magnéticamente durante 15 minutos. Después se le aplicó vacío durante 30 minutos para eliminar el aire disuelto en la solución, y se vertió en placas Petri esterilizadas. Finalmente, se secaron a 41°C por 12 horas en un deshidratador (Excalibur 4900, España). Una vez formadas, las películas se despegaron y acondicionaron, en un desecador con una solución saturada de Cl_2Mg , durante al menos 24 h antes de la prueba.

Cuadro 1. Nomenclatura y formulación final de las soluciones formadoras de película

Nomenclatura	Almidón (% p/p)	Glicerol (% p/p)	Sorbitol (% p/p)
AG1	1	1.5	-
AG2	1	1	-
AG3	1	0.05	-
AS1	1	-	1.5
AS2	1	-	1
AS3	1	-	0.05

Fuente: Elaboración propia

Caracterización de la película comestible

Espesor

El grosor de la película se midió mediante un micrómetro (Modelo MDC-1 "SB", AMES, EE.UU.), con una precisión de 0.001 mm. El espesor promedio se calculó a partir de cinco mediciones tomadas al azar, en distintos lugares de cada película.

Actividad de agua y pH

La actividad de agua (A_w) de las películas preacondicionadas se determinó mediante el equipo Hygrolab (Rotronic, Bassersdorf, Suiza), colocando discos de 30 mm de diámetro sobre el porta muestras del equipo. Para la determinación del pH se pesó un 1g de muestra y se le adicionó 100 ml de agua destilada, posteriormente se disolvió y se midió con el potenciómetro (Thermo Fisher Scientific Inc., UK.).

Color

El color se determinó con el colorímetro CR-400 Minolta Croma Meter (Konika Minolta, Valencia, España). Se colocaron muestras de películas en la superficie de la placa estándar blanca, (valores de placa de calibración $L^* = 97.72$, $a^* = -0.39$ y $b^* = 1.70$) y los parámetros de color L^* , a^* , b^* se midieron utilizando la escala de color CIELAB: $L^* = 0$ (negro) a $L^* = 100$ (blanco), $-a^*$ (verde) a $+a^*$ (enrojecimiento) y $-b^*$ (azul) a $+b^*$ (amarillo). Se calculó la diferencia de color (ΔE^*) para las películas de malanga de la siguiente manera:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

Espectroscopia Infrarroja (FTIR)

Para la caracterización del almidón obtenido se utilizó un Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) (Bruker, Vertex, Wisconsin, EE.UU.) mediante Reflectancia Total Atenuada (ATR). Los espectros se obtuvieron por triplicado. Se utilizaron 64 barridos con una resolución de 4 cm⁻¹ en la región espectral de 4000-400 cm⁻¹. Para el análisis de los espectros se utilizó el programa Origin 6.1 (OriginLab Corporation, EE.UU.).

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) por medio del programa estadístico SAS ® (Statistical Analysis System, EE.UU.). Las pruebas de medias se realizaron empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia establecido en $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las películas del almidón de la malanga, mostraron ser homogéneas, delgadas, flexibles e incoloras (Figura 1).

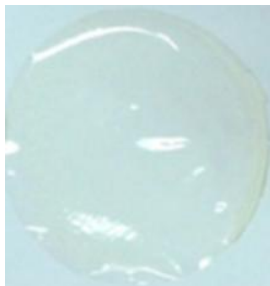


Figura 2. Apariencia de la película de almidón de malanga (*Colocasia esculenta*)

De acuerdo a lo observado, la actividad de agua que mostraron las películas fue cercana a 6 (Cuadro 2) y es la cantidad de agua disponible en la película para poder llevar a cabo reacciones químicas, enzimáticas y el desarrollo de actividad microbiana, cuando se pone en contacto con el alimento. Los tratamientos que resultaron distintos en los parámetros de pH y Aw, fueron a los que se les adicionó glicerol como plastificante, esto probablemente a que este compuesto es sumamente higroscópico, y por lo tanto, las películas formadas presentan una mayor actividad de agua y un contenido más amplio de iones OH.

Cuadro 2. Determinación de la actividad de agua, pH y espesor de las distintas películas de almidón de malanga, obtenidas con diferentes tipos y concentraciones de plastificante

Película	Aw	pH	Espesor (mm)
AG1	0.676 ± 0.023 ^c	6.87 ± 0.007 ^a	0.12 ± 0.001 ^a
AG2	0.649 ± 0.021 ^c	6.83 ± 0.036 ^a	0.13 ± 0.003 ^a
AG3	0.663 ± 0.017 ^c	6.73 ± 0.035 ^b	0.11 ± 0.002 ^a
AS1	0.491 ± 0.016 ^a	6.75 ± 0.058 ^b	0.13 ± 0.001 ^a
AS2	0.589 ± 0.018 ^b	6.71 ± 0.056 ^b	0.12 ± 0.004 ^a
AS3	0.619 ± 0.004 ^{bc}	6.74 ± 0.030 ^b	0.12 ± 0.003 ^a

Los valores reportados para cada película de almidón son sus medias ± desviación estándar (n = 5). Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.005$), de acuerdo a la prueba de Tukey.

Los parámetros de color L^* , a^* , b^* y ΔE^* de las películas estudiadas se muestran en el Cuadro 2. Las películas de almidón con diferente tipo y concentración de gelificante no mostraron diferencias significativas en los parámetros de color ($p < 0.05$).

En general, los valores ópticos de la película presentados aquí tienen buena transparencia, comparados con otras películas elaboradas de diferentes tipos de almidones. De acuerdo a Flores et al. (2007) para películas de almidón de tapioca: $L = 85.42$, $a = -1.08$ y $b = 5.02$, en el caso de películas de papa $L = 95.70$, $a = -5.14$ y $b = 7.38$ (Zavareze *et al.*, 2010) y para los valores para los sistemas de almidón de quínoa: $L = 92.86$, $a = -0.87$ y $b = 1.96$ (Araujo-Farro *et al.*, 2010).

Los parámetros de color (a^* , b^*) también muestran diferencias entre los almidones, debido a que existe una dependencia entre el origen del almidón (relación amilosa/amilopectina, tamaño y forma de los gránulos de almidón), así como también del grosor (Basiak *et al.*, 2017). En cualquier caso, la magnitud de a y b no interfieren con la percepción del color en los consumidores de productos alimenticios recubiertos con este tipo de biomateriales.

Cuadro 3. Parámetros de color CIE-Lab (L^* , a^* y b^*) y la diferencia de color total (ΔE^*) de las películas de almidón de malanga, obtenidas con diferentes tipos y concentraciones de plastificante

Película	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
AG1	95.6 ± 0.8^a	-0.7 ± 0.2^a	4.8 ± 1.7^a	3.8 ± 1.8^a
AG2	94.7 ± 0.2^a	-0.9 ± 0.1^a	6.5 ± 1.2^a	5.8 ± 2.1^a
AG3	96.8 ± 0.7^a	-0.7 ± 0.1^a	4.5 ± 0.1^a	3.0 ± 0.3^a
AS1	93.6 ± 0.8^a	-0.8 ± 0.1^a	3.9 ± 0.2^a	4.7 ± 0.8^a
AS2	92.9 ± 0.7^a	-0.8 ± 0.2^a	4.1 ± 0.3^a	4.8 ± 0.5^a
AS3	94.1 ± 0.2^a	-0.7 ± 0.2^a	4.4 ± 0.1^a	5.1 ± 0.3^a

Los valores reportados para cada película de almidón son sus medias \pm desviación estándar ($n = 5$). Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.005$), de acuerdo a la prueba de Tukey.

Espectroscopia Infrarroja (FTIR)

El almidón obtenido se caracterizó por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). En la Figura 2 se muestra el espectro FTIR del almidón el cual presenta las bandas características para este tipo de compuesto. Para el almidón los principales picos se muestran en 3438 cm^{-1} y se atribuye al estiramiento de los grupos OH; en 2927 cm^{-1} indicando el estiramiento del enlace C-H así como a 1463 cm^{-1} de la vibración tipo doblez en el plano de los grupos CH en el anillo de glucosa en la estructura del almidón. Similares resultados fueron reportados anteriormente (thawale & Rathi, 1997).

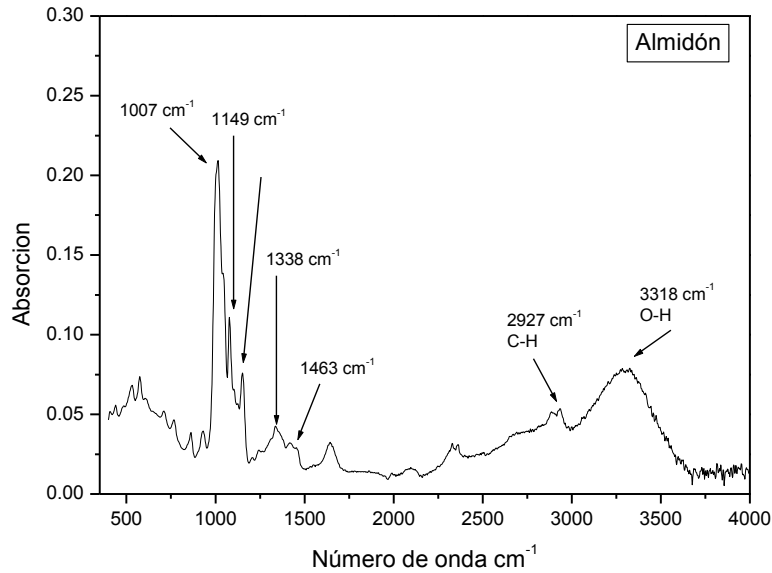


Figura 2. Espectro FTIR típico de almidón obtenido de malanga (*Colocasia esculenta*).

En la Figura 3 se presentan los espectros FTIR de almidón común y del almidón extraído de la malanga, como se puede observar ambos espectros no presentaron cambios en su línea base, lo que nos indica que el proceso de extracción de almidón de la malanga fue el correcto.

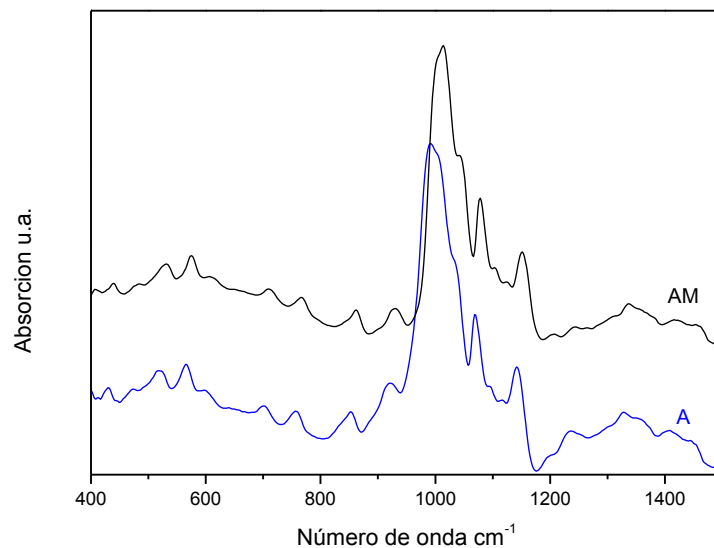


Figura 3. Espectro FTIR de almidones natural (A) y de malanga (*Colocasia esculenta*) (AM).

CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que es posible preparar películas de almidón de malanga, mediante la incorporación de distintos plastificantes. Este material comestible podría usarse como un envase inteligente para alimentos, ya que podrían proporcionar información sobre el deterioro de los alimentos indirectamente a través de la medición del pH de los medios, extender la vida útil de los alimentos y además ser biodegradable.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y a la línea de investigación LGAC 2 de la Maestría en Ciencias en Innovación Agroalimentaria Sustentable del Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba por el apoyo brindado para la realización de la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Araujo-Farro, P.C., Podadera, G., Sobral, P.J.A., Menegalli, F.C., 2010. Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. *Carbohydr. Polym.* 81, 839–848.
2. Athawale, V. D.; Rathi, S. C.; *Eur. Polym. J.* 1997, 33, 1067.
3. Basiak, E., Lenart, A., Debeaufort, F., 2017. Effect of starch type on the physico-chemical properties of edible films. *Int. J. Biol. Macromol.* 98, 348–356.
4. Campos, C. A., Gerschenson, L. N. y Flores S. K. 2011. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technol.* 4:849-875
5. Flores, S., Famá, L., Rojas, A.M., Goyanes, S., Gerschenson, L., 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Res. Int., Starch Functionality III* 40, 257–265.
6. Guilbert, S., Gontard, N., y Gorris L. 2006. Prolongation of the shelflife of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologies.* 29, 10-17.
7. Muscat, D., Adhikari, B., Adhikari, R., Chaudhary, D.S., 2012. Comparative study of film forming behaviour of low and high amylose starches using glycerol and xylitol as plasticizers. *J. Food Eng.* 109, 189–201.
8. Njintang, N.Y., Mbofung, C.M., Balaam, F., Kitissou, P., Scher, J., 2008. Effect of taro (*Colocasia esculenta*) flour addition on the functional and alveographic properties of wheat flour and dough. *J. Sci. Food Agric.* 88, 273–279.
9. Piyada, K., Waranyou, S., Thawien, W., 2013. Mechanical, thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. *Int. Food Res. J.* 20, 439–449.
10. Rapelo, A.L.T., Montero-Castillo, P.M., Julio-González, L.C., 2014. Utilization of taro starch (*Colocasia esculenta* L.) In the elaboration of frankfurt sausages 12, 9-16.
11. Rojas-Graü, M., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. 2009. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. *International Journal of Food Science and Technology.* 44(5):875-889.
12. Savadekar, N.R., Mhaske, S.T., 2012. Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydr. Polym.* 89, 146–151.
13. Zavareze, E. da R., Storck, C.R., de Castro, L.A.S., Schirmer, M.A., Dias, A.R.G., 2010. Effect of heat-moisture treatment on rice starch of varying amylose content. *Food Chem.* 121, 358–365.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Minerva Rosas Morales, Javier Huanetl Coatl, Miguel Ángel Plascencia Espinosa, Ada María Ríos Cortes

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (IPN-CIBA)
Tlaxcala.

RESUMEN

Se evaluó la actividad enzimática en café tostado y molido, se utilizaron cuatro enzimas (Mezcla de celulasas presentación sólida, mezcla enzimática de celulasas líquida (Celuzyme), Hemicelulasas (Harizyme HL) sólida y un concentrado de glucoamilasas sólida (Glucozyme), se midió la respuesta mediante la cuantificación de azúcares reductores por el método DNS y el % de sólidos solubles dados en °Brix. Se utilizó como materia prima café tostado y molido clasificado como café Premium de consumo. Se evaluó la concentración óptima de cada enzima (4, 8, y 20 mg/g), a temperatura de (45, 60 y 72 °C) y diferentes combinaciones enzimáticas (celulasas, hemicelulasas y glucoamilasa). Los ensayos se realizaron por duplicado, los resultados se analizaron estadísticamente por el método de ANOVA. Respecto al % de sólidos solubles no se observó diferencia significativa, encontrándose en todos los extractos 4.5 °Brix. Se encontró mejor actividad enzimática para celulasas y hemicelulasas a concentración de 8 mg/g de sustrato, generaron 4.8 g/L de azúcares reductores y para glucoamilasa a concentración de 15 mg/g se generó 3 g/L de azúcares reductores a 45 °C después de 24 horas. Respecto a las mezclas se encontró actividad considerable a concentración de 4mg/g Celulosa, 4 mg/g Harizyme HL y 7.5 mg/g glucoamilasa de enzima/sustrato respectivamente produciendo 6.65 g/L de azúcares reductores respecto al blanco a 45 °C después de 24 horas.

Palabras Clave: Enzimas, extracto de café, azúcares reductores.

INTRODUCCIÓN

El café es el segundo "commodity" más comercializado en el mundo, solo superado por el petróleo. Existen dos especies; *Coffea arabica* (café arábico) y *Coffea canephora* (café robusta), con una producción de 70 y 30% respectivamente. Actualmente los productos de café están en creciente demanda ya sea en presentaciones de confitería, aromas y principalmente bebidas, la elaboración de estos productos es a partir de extractos de café, los cuales se obtienen por lixiviación del café tostado y molido a temperaturas de 180 °C, sin embargo este proceso produce sabores poco agradables y pérdida del aroma. Los extractos de café pueden ser producidos por otros procesos como síntesis química, precursores de sabor, sabores sintéticos, etc. En el presente trabajo se evaluó el uso celulasas en polvo y celulosa líquida (Celuzyme), hemicelulasas (Harizyme HL) y glucoamilasas (glucozyme) para obtener extractos de calidad con mejor aroma y sabor sin emplear temperaturas de 180 °C, como respuesta se determinó la concentración de azúcares reductores ya que las enzimas actúan sobre la pared celular del grano constituida por celulosa y hemicelulosa principalmente arabinogalactanos, arabinoxilanos y galactomananos, rompen enlaces, formando oligosacáridos y monosacáridos, aumentando así la cantidad de sólidos solubles y evitando la pérdida de las propiedades organolépticas.

TEORÍA

Un punto importante para obtener un extracto de calidad es entender que productos se generan durante el proceso de tostión. Andrea Illy and Viani R. (2005) describen en su libro *Espresso Coffee: The Science of Quality* los cambios macroscópicos del grano por efecto de la temperatura dentro del grano:

- 20 – 130 °C: Transición de agua de líquido-vapor.
- 130 – 140 °C: Coloración amarilla e hinchazón del grano con inicio de coloración no enzimática, se forman gases del tostado y empiezan a evaporarse.
- 140 – 160 °C: Serie compleja de picos endotérmicos y exotérmicos. El color cambia a marrón claro. Gran aumento en volumen del grano y microporos. Los restos de piel de plata se

eliminan. El grano es muy quebradizo. Algunas pequeñas fisuras en la superficie ocurren. Comienza la formación del aroma.

- 160 – 190 °C: Las reacciones de tostado se mueven hacia la estructura seca interna del grano
- 190 – 220 °C: Micro fisuras dentro del grano. Escapes de humo, gran volumen de escape de dióxido de carbono dejando el grano muy poroso. Aparece el sabor típico del café tostado.

Químicamente el agua y dióxido de carbono son liberados por las más importantes reacciones de Maillard las cuales dan el color al producto, las melanoidinas, y gran parte de los aromáticos volátiles. Decremento de la densidad del grano de 500-700 g/L a 300-450 g/L, destrucción de carbohidratos complejos, ácido clorogénico, trigolina, los aminoácidos aumentan en porcentaje conforme aumenta la temperatura, por ejemplo en un tostado ligero varía entre 1 a 5 % en un tostado oscuro llegan a estar cerca del 12 %. El contenido de aromas alcanza un máximo a tostados bajos. El pH varía de 4.9 para tostados bajos o cerca de 5.4 para tostados oscuros. La tabla 1 describe los componentes mayoritarios presentes en el grano de café tostado, El mayor % está representado por polisacáridos dentro de los cuales se encuentran hemicelulosas como galactomananos (cadenas con enlaces 1-4 entre galactosa y mananos) y arabinogalactanos (cadenas con enlaces 1-3 entre arabinosa y galactosa), celulosa y pectinas. (Illy y col. 2005)

Componente	Café Arabica	Café Robusta
Proteínas y Aminoácidos	7.5	7.5
Azucares	38.3	42.3
Sacarosa	0	0
Azucares reductores	0.3	0.3
Polisacaridos	38	42
Otros azucares	ND	ND
Acidos	4.5	6.4
Clorogénicos	2.5	3.8
Alifáticos	1.6	1.6
Químico	0.8	1
Lípidos	17	11
Minerales	4.5	4.7
Cafeína	1.3	2.4
Trigonelina	1	0.7
Prod. Caramelizados y condensación (por diferencia)	25.4	25
TOTAL	100	100

Tabla 1. Componentes de café tostado de arábico y robusta

Las enzimas elegidas para este trabajo tienen la capacidad hidrolítica sobre polisacáridos, estas enzimas son celulasas, hemicelulasas y glucoamilasas.

Celulasas

Los productos celulíticos comerciales son preparados enzimáticos que contienen principalmente actividad celulítica, dentro de las enzimas presentes están la Endo- β -1,4-glucanasa, Exo- β -1,4-glucanasa y β -1,4-glucosidasa. La hidrólisis de la celulosa por este complejo puede resumirse en 3 etapas:

1. Endo- β -1,4-glucanasa tiene actividad al azar sobre enlaces β -1,4-glucosídicos internos presentes en la celulosa, convirtiendo las cadenas largas a oligosacáridos, actúa en las regiones amorfas y sobre la superficie disminuyendo la longitud de las cadenas de celulosa y creando nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato.

2. Exo- β -1,4-glucanasa actúa sobre 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, la región cristalina comienza a ser hidrolizada como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa.
3. La celobiosa es hidrolizada a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa. esta es una molécula producto de la reacción enzimática del segundo paso, inhibe la endoglucanasa y exoglucanasa por lo cual la actividad enzimática se ve limitada después de un tiempo. (Ovando-Chacón y col. 2005).

Hemicelulasas

El término *hemicelulasas* designa una familia de enzimas que tienen como sustrato hemicelulosa compuesta principalmente por monómeros de β -D-Manosa, β -D-Xilosa, β -D-Glucosa α -D-galactosa, α -L-Arabinosa (furanosa) α -L-arabinosa (Piranosas), ácido β -D Galactourónico, ácido β -D-Glucourónico, ácido α -D-4-o-Metilglucouronio unidos por enlaces β -1-4 y β -1-6 por tal motivo es una molécula ramificada. Dentro de las enzimas en esta familia se encuentran: α -L-arabinofuranosidasa, endo1,4- β -xilanasas, endo-1,4- β -manasa y β -xilosidasas.

Glucoamilasas

La glucoamilasa también conocida como amiloglucosidasa es una exo-1,4-alfa-glucosidasa que pertenece a la familia de las hidrolasas la cual cataliza la liberación de sucesivas unidades de glucosa en regiones terminales de diferentes compuestos como el almidón, la enzima puede hidrolizar tanto las ramificaciones alfa-D-1,6 como los enlaces poliméricos alfa-D-1,4.

PARTE EXPERIMENTAL

Enzimas

Se emplearon enzimas comerciales de la empresa ENMEX aprobadas para su uso en alimentos. Dentro de las cuales se encontraba una mezcla de Celulasas en polvo sin nombre comercial, Mezcla enzimática de celulasas en presentación líquida Celuzyme BL con actividad enzimática de 64,010 CMCase/g, hemicelulasas (Harizyme HL) con una actividad xilanasas AXA de 7,980 U/g y una glucoamilasa ((Glucozyme Concentrado) (GCP)) con actividad enzimática de 1,102 DU/g.

Determinación de la concentración óptima

Se pesaron 5g de café molido fino en un tubo falcón, se adicionaron las enzimas de forma individual por tubo a una concentración de 4, 8 y 20 mg/g de sustrato (Celulasa, Harizyme HL y Glucozyme) y de 4, 8 y 20 μ l/g de sustrato (Celuzyme). Se adicionaron 30 ml de agua de garrafón se mezclaron perfectamente y se incubaron a 45 °C durante 24 horas. Se tomaron muestras a las 0, 3, 6 y 24 horas. La actividad enzimática se determinó por la concentración de azúcares reductores cuantificados por el método de DNS. Los experimentos fueron realizados por duplicado y analizados por ANOVA de un factor.

Determinación de la temperatura óptima

Se determinó la temperatura óptima para cada enzima Celulasa, Harizyme HL, Celuzyme y Glucozyme. Se pesaron 5g de café molido fino, se adiciono la enzima de forma individual a una concentración de 8 mg/g de sustrato para Celulasa y Harizyme HL, en el caso de Celuzyme se adicionaron 8 μ l/g de sustrato y para Glucozyme se adicionaron 15 mg/g de sustrato, se eligieron estas concentraciones por presentar mejor actividad enzimática. Cada enzima se incubo a 45, 60 y 72 °C. Se tomaron muestras a las 0, 6 y 24 horas. La actividad enzimática se determinó por la concentración de azúcares reductores cuantificados por el método de DNS.

Determinación de la actividad enzimática con diferentes mezclas de enzima

Se cuantifico la actividad enzimática de diferentes mezclas de enzimas partiendo de sus óptimos de acuerdo a su actividad de forma individual. Se pesaron 5 g de café molido, las enzimas se pesaron de acuerdo a la tabla 2, en el mismo experimento se volvieron a correr las enzimas usadas de forma individual para evitar interferencias en el experimento de esta forma todas las enzimas tuvieron las mismas condiciones. Los tubos se incubaron a 45 °C.

	<i>Celulasa</i>	<i>Harizyme HL</i>	<i>Glucozyme</i>
Blanco	-	-	-
Mezcla 1	8 mg/g	8 mg/g	15 mg/g
Mezcla 2	4 mg/g	4 mg/g	7.5 mg/g
Mezcla 3	2 mg/g	2 mg/g	3.75 mg/g
Celulasa (solida)	8 mg/g	-	-
Harizyme HL	-	8 mg/g	-
Glucozyme	-	-	15 mg/g

Tabla 2. Concentracion de Celulasa, Harizyme HL y Glucozyme usadas en las mezclas enzimáticas

Determinación de °Brix

Se determinó el % de solidos solubles mediante un refractómetro de campo con una escala de 0 a 32 °brix.

Se centrifugo la muestra durante 1 min a 4000 rpm, se tomó una gota y se colocó sobre el prisma del refractómetro. Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente, entre los 22 – 24 °C. Cuantificación de azúcares reductores por el método DNS

Los azúcares reductores generados por hidrolisis enzimática fueron determinados por el método DNS (miller, 1959). La muestra se centrifugo a 4000 rpm durante 1 min, se realizó una dilución 1:10 con agua, se tomaron 500 µL de muestra y se mezclaron con 500 µL de reactivo DNS, agitando rápidamente. La mezcla se colocó en baño con agua hirviendo (aprox. 94 °C) durante 5 min, transcurrido el tiempo se enfrió en un baño de hielo. Se agregaron 5 ml de agua destilada y se agito vigorosamente. La lectura se realizó en un espectrofotometro (absorbancia a 540 nm). Mediante una curva de calibración de glucosa a una concentración de 0.2 a 2.0 g/L.

RESULTADOS

Determinación de la concentración optima enzimática

Se graficó la concentración de azúcares reductores (g/L) respecto al tiempo (horas) para cada enzima a 45 °C. La celulasa solida mostro un incremento en su actividad conforme aumentaba la concentración, respecto al blanco mostro un incremento de 4.73 g/L de azúcares reductores a las 24 horas de reacción con una concentración de enzima de 20 mg/g de sustrato, mostro diferencia significativa para cada una de las concentraciones empleadas ($p < 0.005$) sin embargo usar concentraciones elevadas de enzimas no es redituable a nivel industrial por tal motivo se consideró una concentración optima de 8 mg/g de sustrato la cual aumento 2.9 g/L de azúcares reductores respecto al blanco (Grafico 1).

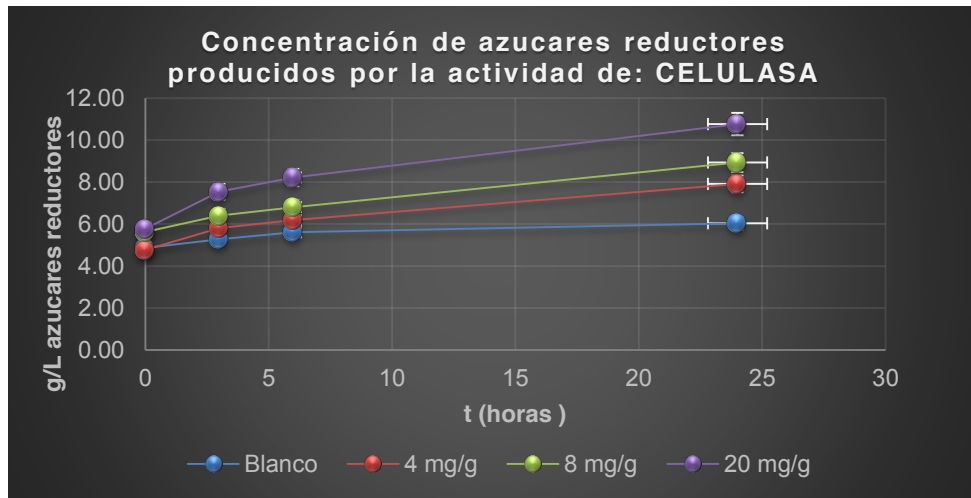


Gráfico 1. Actividad enzimática de celulasa sólida a diferentes concentraciones (B: sin enzima, 4 mg/g, 8 mg/g y 20 mg/g de sustrato).

La celulasa líquida (Celuzyme) generó un aumento de 2.77 g/L de azúcares reductores después de 24 horas a una concentración de 20 $\mu\text{l/g}$ de sustrato, comparando con la celulasa sólida existe diferencia significativa ($p < 0.005$) considerando los mismos parámetros de reacción (24 horas, 45 °C), 20 mg/g) por tal motivo se decidió trabajar solo con la celulasa sólida por su mejor actividad (Gráfico 2).

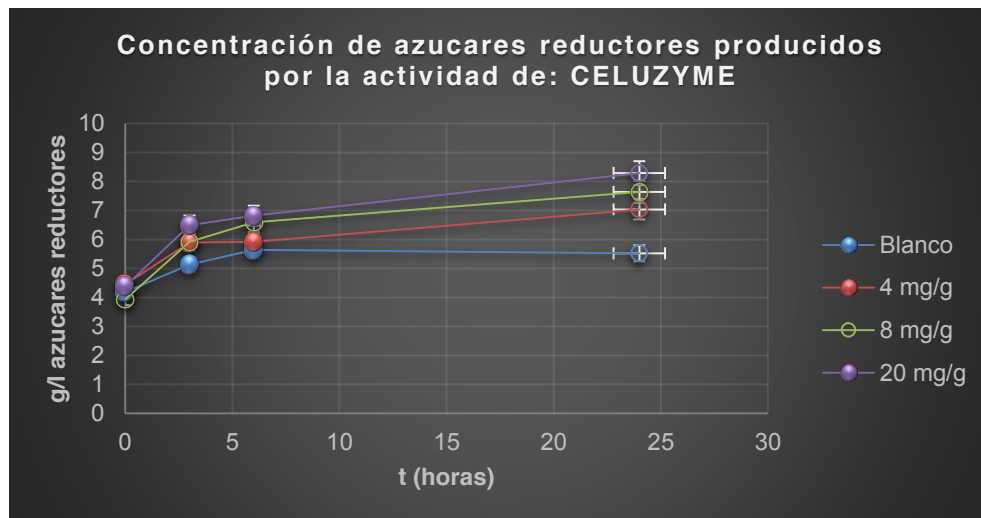


Gráfico 2. Actividad enzimática de la Celulasa líquida (Celuzyme) a diferentes concentraciones (B: sin enzima, 4 mg/g, 8 mg/g y 20 mg/g de sustrato).

El empleo de hemicelulasas generó un incremento de 4.72 g/L de azúcares reductores con una concentración de enzima de 20 mg/g de sustrato, estadísticamente existe diferencia significativa entre cada concentración, sin embargo utilizar la concentración mas alta aumenta los costos de producción por tal motivo se manejó 8 mg/g de sustrato de enzima Harizyme HL como la concentración óptima a 45 °C (Grafico 3).

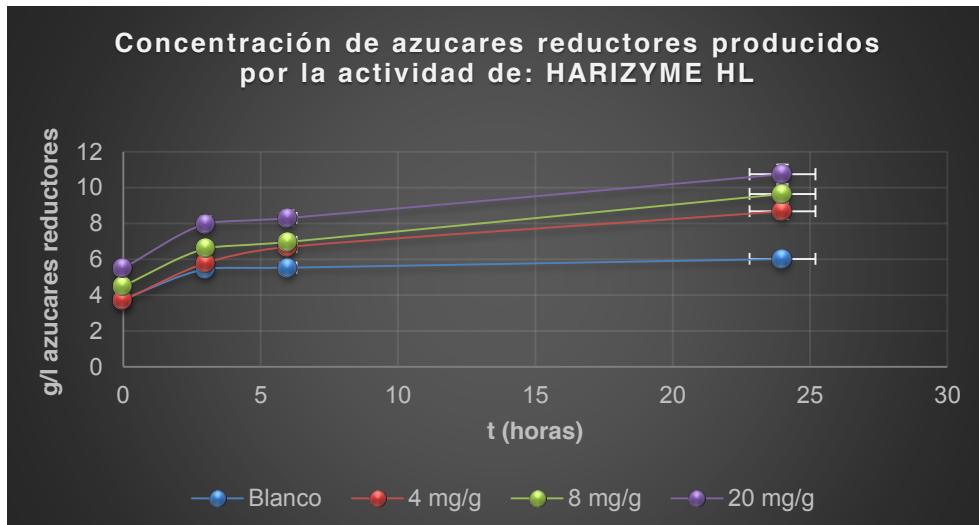


Grafico 3. Actividad enzimática de la hemicelulasa (Harizyme HL) a diferentes concentraciones (B: sin enzima, 4 mg/g, 8 mg/g y 20 mg/g de sustrato).

Glucozyme a pesar de ser una glucoamilasa la cual hidroliza enlaces de los residuos de glucosa a diferentes compuestos, se decidió emplear para degradar los residuos resultantes de compuestos oligoméricos que pueden tener residuos de glucosa o xilosa sobre los cuales tiene actividad la enzima. La actividad individual de la enzima Glucozyme aumenta 4.02 g/L de azúcares reductores empleando 20 mg/g de sustrato, la diferencia entre usar una concentración de 8 mg/g de enzima es de 1.86 g/L, por tal motivo se decidió fijar su concentración óptima a 15 mg/g de sustrato. (Grafico 4)

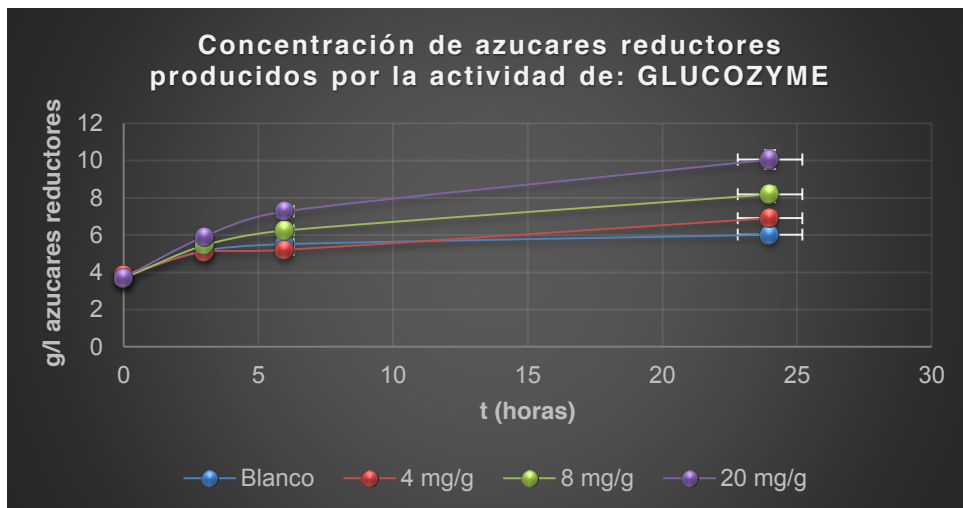


Grafico 4. Actividad enzimática de la Glucoamilasa (Glucozyme) a diferentes concentraciones (B: sin enzima, 4 mg/g, 8 mg/g y 20 mg/g de sustrato).

Entre las enzimas celulasa sólida, hemicelulasa no existe diferencia significativa usando sus concentraciones óptimas de 8 mg/g de sustrato a 45 °C con 5 g de café en cuanto a la producción de azúcares reductores después de 24 horas de acuerdo al análisis estadístico ANOVA

Determinación de la temperatura óptima

Se evaluaron las enzimas Celulasa, Harizyme HL y Glucozyme a 3 diferentes temperaturas (45, 60 y 72 °C) para encontrar la temperatura óptima, mientras que la celulosa aumenta su actividad conforme aumenta la temperatura, Glucozyme reduce su actividad, Harizyme HL tiene su mejor actividad a 60 °C.

La Celulasa aumenta 1.02 g/L de azúcares reductores cuando la temperatura aumenta de 45°C a 72 °C de igual manera Harizyme HL aumenta 1 g/L de azúcares reductores cuando aumenta de 45 a 60 °C sin embargo conforme sigue aumentando la temperatura disminuye su actividad. Glucozyme reduce su actividad al aumentar la temperatura reduciendo 1.20 g/L de azúcares reductores (Grafica 5).

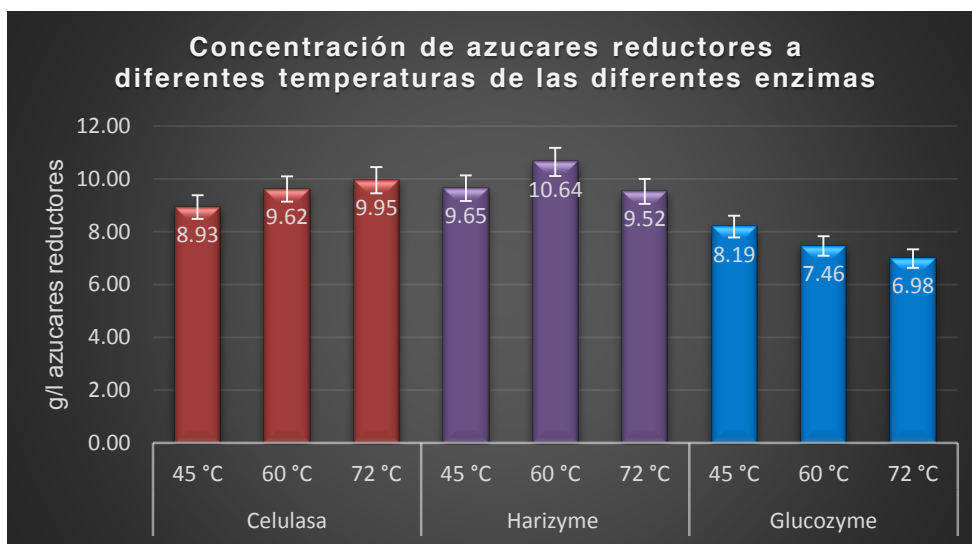


Grafico 5. Concentración de azúcares reductores producidos por la actividad enzimática de Celulasa (8mg/g), Harizyme HL (8mg/g) y Glucozyme (15mg/g) a diferentes temperaturas 45 °C, 60°C y 72 °C.

Determinación de °Brix

Las determinaciones de °Brix no mostraron diferencia significativa siendo la media 4.5 °Brix para el blanco como para las mezclas enzimáticas.

Determinación de la actividad enzimática con diferentes mezclas de enzima

La evaluación de la actividad enzimática de diferentes mezclas de enzimas (tabla 2), partiendo de las concentraciones óptimas (Celulasa 8 mg/g, Harizyme HL 8 mg /g y Glucozyme 15 mg/g). La mezcla 1 mostro un aumento de azúcares reductores de 8.01 g/L comparado con Harizyme HL enzima que presento la mayor actividad individualmente solo genero un incremento de 4.71 g/L de azúcares reductores. La mezcla 2 de igual manera presento diferencia significativa muy marcada, presento un aumento de 6.65 g/L de azúcares reductores lo que significaría un aumento de rendimiento del 41 % más que la actividad de la enzima individual Harizyme HL. La mezcla 3 no mostro diferencia significativa comparado con la actividad enzimática de Harizyme HL (Grafico 6).

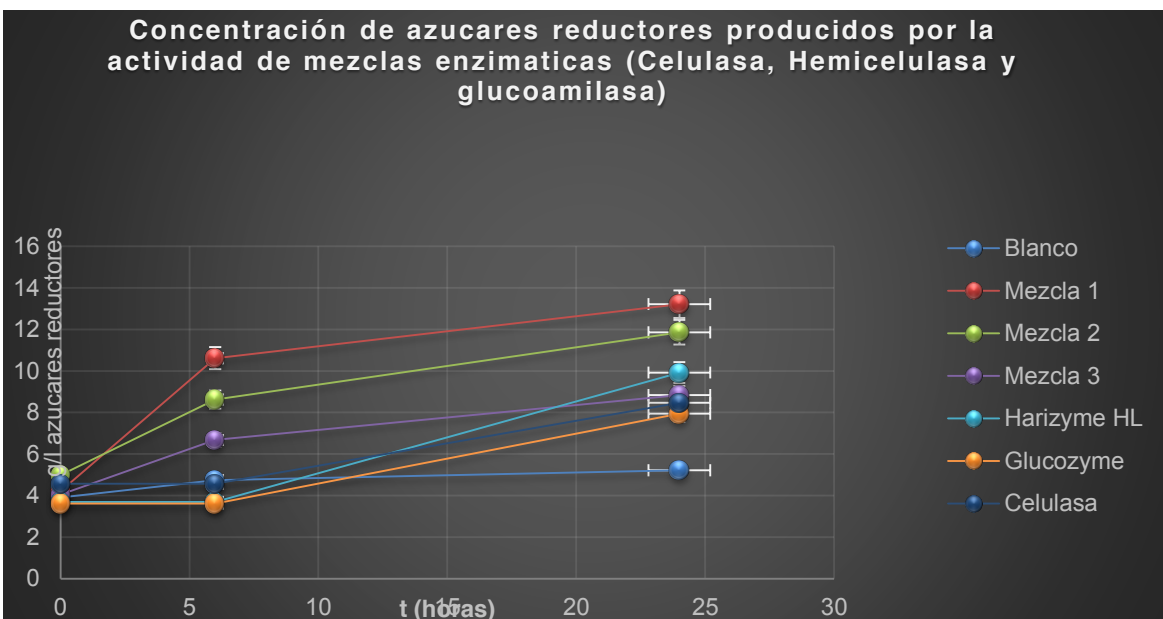


Gráfico 6. Concentración de azúcares reductores producidos por la actividad enzimática de: Mezcla 1 (celulasa 8 mg/g, Harizyme 8 mg/g y Glucozyme 15 mg/g) mezcla 2 (celulasa 4 mg/g, Harizyme 4 mg/g y Glucozyme 7.5 mg/g) y mezcla 3 (celulasa 2 mg/g, Harizyme 2 mg/g y Glucozyme 3.75 mg/g), y las enzimas individualmente de la mezcla 1 las mismas concentraciones. Se incubaron a 45 °C por 24 horas.

CONCLUSIONES

El empleo de enzimas favorece el incremento de azúcares reductores, estos azúcares provienen de las estructuras complejas como celulosa y hemicelulosas las cuales pueden tener atrapados compuestos de bajo peso molecular como aceites donde se encuentran esteroides, tocoferoles entre otros que proporcionan aroma y sabor al café, otro factor importante es la disminución de la viscosidad por acción enzimática reduciendo así el tiempo de extracción.

Se encontró que la concentración entre las celulasas sólida y líquida (Celuzyme) existe diferencia significativa siendo la celulosa sólida la que presenta una mayor actividad enzimática aumenta en 2 g/L la concentración de azúcares reductores más que la enzima en presentación líquida con una concentración de 8 mg/g de sustrato a 45 °C.

La implementación de una mezcla tienen actividades superiores a la que tendría cada enzima individualmente además el uso de enzima se reduce a la mitad de concentración respecto al óptimo individual entonces se usarían concentraciones de 4 mg/g de Celulosa sólida, 4 mg/g de Harizyme HL y 7.5 mg/g de Glucozyme.

La actividad de las enzimas a diferentes temperaturas favorece el proceso, no requiere un estricto control de la temperatura reduciendo así costos en sofisticados equipos para la regulación térmica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aehle, W. (Ed.). (2007). *Enzymes in industry: production and applications*. Weinheim, Alemania: WILEY-VCH.
2. Andrea Illy., & Viani, R. (eds.). (2005). *Espresso coffee: the science of quality*. San Diego California. Elsevier Academic press.
3. Arbeláez, B., Luna, F. R., & Ce Orozco Gallego, L. (2001). *Utilización de enzimas hidrolíticas y métodos combinados en la extracción de café*. *Cenicafé* v. 52 (4) p. 310-319.
4. Cedrssa. (2014). *Producción y mercado de café en el mundo y en México*. México, D.F.

5. Delgado, P. A., Vignoli, J. A., Siika-Aho, M., & Franco, T. T. (2008). *Sediments in coffee extracts: composition and control by enzymatic hydrolysis*. Food chemistry, v. 110(1), 168-176.
6. Sagarpa. (2015). *Carpeta de difusión, convención internacional del café México 2015*. México. D.F.
7. Wang, C. C., Chou, Y. Y., Sheu, S. R., Jang, M. J., & Chen, T. H. (2011). Application of ultrasound thermal process on extracting flavor and caffeine of coffee. Thermal Science, 15(suppl. 1), 69-74.
8. Yang, N., Liu, C., Liu, X., Degn, T. K., Munchow, M., & Fisk, I. (2016). *Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects*. Food chemistry, v. 211, 206-214.

FERTILIZACIÓN ORGÁNICA EN LA PRODUCCIÓN DE PEPINO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

Jorge Humberto Medina Villarreal, Mariano Ángel Valdivia Dávila, Ofelia Iñiguez Gómez, Olga Mora García

Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara

INTRODUCCIÓN

La actividad principal en la Región de los Altos de Jalisco, es por excelencia pecuaria y los productores de esta zona han estado buscando nuevas opciones con otros cultivos con el fin de incrementar sus ingresos, mediante la aplicación de fertilizantes foliares orgánicos, con un uso y manejo eficiente de riego, en cultivos nuevos como son las hortalizas el objetivo de este trabajo fue realizar un proyecto encaminado a la producción de nuevas opciones o alternativas hortícolas con la aplicación de fertilizantes foliares orgánicos, con riego por goteo bajo condiciones de invernadero. La producción orgánica en México se inicia en la década de los ochenta en cultivos hortícolas, las cuales han representado una fuente de alimentación a lo largo de la historia de la humanidad, actualmente se les confiere de alto valor dietético y por su versatilidad de consumo tanto en fresco como procesado, obtienen gran importancia en su interacción con el hombre.

El hombre en la búsqueda de mejores alternativas de conservación de los recursos renovables ha probado diferentes técnicas y materiales y se ha logrado aumentar la producción, acelerar la maduración de los cultivos, mejorar la calidad, reducir el número de aplicaciones de agroquímicos y fertilizantes, además de disminuir la mano de obra en diferentes labores entre ellas el control de maleza y aplicación de riegos.

Finalmente las razones que justifican la producción de pepino empleando fertilizantes orgánico bajo condiciones de invernadero y riego por goteo pueden permitir: a) ahorro de energía fósil b) ahorro de agua, c) disminución drástica de la contaminación del suelo, agua y atmosfera) mayor rentabilidad de la inversión. Las ventajas sobre la agricultura convencional serán evidentes a corto y sobre todo a largo plazo.

IMPORTANCIA DE LA FERTILIZACIÓN ORGÁNICA

La base de la fertilidad de los suelos, está representada por el "humus". La actividad de la vida del suelo (microflora y micro fauna) depende de la presencia de materia orgánica y naturalmente de factores tales como agua, aire, temperatura, pH, etc. Los microorganismos del suelo atacan a la materia orgánica y transforman a esta en "humus". (Suquilanda, M. 1996)

Un suelo puede contener todos los elementos necesarios para la nutrición, pero estos pueden no estar disponibles para que sean absorbidos de forma radicular, es por ello que se busca implementar la fertilización foliar. (Rodríguez 1989)

La aspersión de solución nutritiva sobre el follaje de las plantas encuentra su máxima utilidad en la rectificación de las deficiencias de microelementos, todos estos solubles en agua son tóxicos en altas concentraciones. La mayoría de las sales solubles en agua pueden ser absorbidas a través de los estomas de las hojas y ser utilizados inmediatamente. (N.P.N.I. 1980).

La fertilización foliar debe hacerse de manera que moje todo el follaje de la planta, para que este pueda penetrar por los estomas. Otras de las precauciones que se deben de tomar en cuenta al realizar la fertilización son la temperatura ambiente que se tiene al momento de la aplicación ya que a medida que aumenta la temperatura comienza a producirse un secado superficial, disminuyendo la penetración de la solución. (Dick, 2003)

La fertilización orgánica, si bien es importante diferenciar los efectos de los aportes de materia orgánica al suelo. Por una parte está la mejora del suelo en su aspecto físico, esto es textura y estructura del suelo y por otro lado los efectos sobre la química si bien sería más acertado decir sobre la bioquímica del suelo, pues es este quizás el efecto más tangible. (Cussianovich, P. 1996)

La fertilización foliar es un complemento de una buena fertilización de base realizada al suelo, entendiendo por esto la aplicación de nitrógeno, fósforo, azufre y calcio. Su utilización es estratégica, y orientada a suplir deficiencias durante momentos específicos en el ciclo de los cultivos buscando mejorar tanto la calidad como su rendimiento. (www.ffe-sa.com.ar)

Por lo general estos productos aportan nutrientes requeridos por los vegetales en muy baja cantidad, estos nutrientes se denominan micronutrientes encontrándose en este grupo el molibdeno, cobre, cobalto, manganeso, zinc, entre otros. (www.ffe-sa.com.ar)

Uno de los principales beneficios de la práctica es poder aplicar los nutrientes directamente sobre el cultivo, al no depositarse en el suelo elimina la posibilidad de que dentro del mismo existan interacciones físico-químicas que dificulten la utilización por parte del vegetal.

Para que los nutrientes puedan infiltrarse a través de la pared exterior de la célula, uno de los conceptos generalmente aceptados es la infiltración mediante poros a través de la cutícula. (Latorre 1992)

La absorción directamente por los estomas de la hoja no es muy probable, ya que las células guarda también están cubiertas por una capa de cutina similar al resto de la hoja. Esta evidencia se basa en que no hay diferencias de absorción entre pulverizaciones de día (cuando los estomas están abiertos) y de noche (cerrados). (www.fertilizando.com)

OBJETIVOS

- ❖ Evaluar la producción de pepino con la aplicación de diferentes fertilizantes orgánicos en comparación con el testigo con aplicación de composta.
- ❖ Obtener información sobre los fertilizantes orgánicos, procurando que sean los más indicados y los más rentables.
- ❖ Contar con información sobre las mejores opciones en el cultivo de pepino con la aplicación de fertilizantes orgánicos.
- ❖ Reducir la contaminación del ambiente con la aplicación de fertilizantes orgánicos, bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y METODOS

Este contemplo el establecimiento de la parcela con la aplicación de diferentes fertilizantes foliares orgánicos en invernadero, este se realizó en los terrenos del Centro Universitario de los Altos, perteneciente a la U de G ubicado en el Municipio de Tepatitlán de Morelos Jalisco, de acuerdo al calendario de siembras establecido, estas parcelas se establecieron con la aplicación de fertilizantes orgánicos.

TRATAMIENTOS

Los tratamientos y dosis a utilizar fueron:

- 1.- BIO-FOM*Plus polvo a la siembra, más 3 foliares BIO-FOM
- 2.- BIO-FOM*Plus polvo a la siembra, más 3 foliares BIO-FOM
- 3.- BIO-FOM*Plus polvo a la siembra, más 3 foliares BIO-FOM
- 4.- BIO-FOM*Plus polvo a la siembra, más 3 foliares METASOLATE
- 5.- BIO-FOM*Plus polvo a la siembra, más 3 foliares BIO-FOM
- 6.- Testigo sin aplicación de fertilizante solo composta a la siembra

Las parcelas fueron de 11 bolsas o macetas plásticas, colocando las plántulas a una distancia de 30 cm entre planta y planta.

Todos los tratamientos excepto el testigo se iniciaron aplicando el BIO-FOM polvo a la siembra a una dosis de 1 ton/ha, 100 grs por planta y posteriormente se aplicaron los fertilizantes foliares con BIO-FOM liquido 4 lts /ha, 50ml/parcela a los 8, 15, 25,35 y 45 días después de la siembra.

Las variables a medir

- Rendimiento por/ha
- Calidad de fruto**
- Sanidad de planta

Se realizaron 5 aplicaciones de fertilización foliar y se observó que los tratamientos 4 y 5 se vieron afectaron el follaje en la primera aplicación de la fertilización, por lo que se vio en la necesidad de reducir la dosis a 40 ml/ parcela.

RESULTADOS

Los resultados de rendimiento, diámetro y longitud se muestran en el siguiente cuadro:

Tratamiento	Peso kgs	Diámetro cm	Longitud cm
1	3.18	4.90	20.75
2	4.70	5.25	22.40
3	4.05	5.70	23.00
4	2.90	4.60	18.25
5	3.02	4.75	20.50
Testigo	2.77	4.15	17.20

Cuadro 1. Promedio de rendimiento Kg/ha, longitud y diámetro en cm de pepino en 6 cortes

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que los tratamientos (2) BIOFOM polvo más Foliar BF-2 y el tratamiento (3) BIOFOM polvo más Foliar BF-3 superan a todos los demás tratamientos, así mismo se observa todos los tratamientos superaron al testigo al cual solo se le aplico composta

En cuanto al diámetro y longitud se observa que los tratamientos mejores fueron los tratamientos 3 y 2, seguidos de los tratamientos 1 y 5 y al final los tratamientos 4 y el testigo, y al igual que en rendimiento todos los tratamientos superaron al testigo.

BIBLIOGRAFIA

1. Suquilanda, M. 1996. Agricultura orgánica; Alternativa Tecnológica del Futuro. Quito, FUNDAGRO 466pp.
2. Rodríguez V. 1989. Fertilizante, Nutrición Vegetal, Edit. Limusa S.A. México, D.F. pág. 157.
3. N.P.F.I., Manual de fertilización., Editorial Limusa, S.A. pág. 129.
4. Dick. R. et al. 2003. Manual de Fertilización para Hortalizas. Editorial Limusa. S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores Balderas, México. D.F. pág. 105.
5. Latorre, F. 1992. Fisiología Vegetal, Universidad Central de Ecuador. Pág. 166-190.
6. La agricultura orgánica una alternativa económica para mejorar la calidad de vida rural. Costa Rica; IMAS. Pag.91-107
7. <http://www.ffo-sa.com.ar/index.php=news>
8. [http://www.Fertilizando.com/articulos/Aplicación % 20 Foliar de % micronutrientes.asp](http://www.Fertilizando.com/articulos/Aplicación%20Foliarde%20micronutrientes.asp).
9. Cussianovich, P. 1998.

REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE SECADO EN MUESTRAS VEGETALES PRETRATADAS CON ONDAS ULTRASÓNICAS Y MOVIMIENTOS VÓRTEX.

María Elizabeth Serratos Hernández, María Berenice Hernández Prieto, Erick Rodolfo López Almanza y Claudia Angélica Carranco Saldaña.

Instituto Tecnológico Superior de Abasolo. claudia.carrancoecabasolo.edu.mx

RESUMEN

La deshidratación de alimentos presenta ventajas importantes con respecto a otros métodos de conservación, ya que facilita un mejor embalaje y almacenamiento, permite ahorros en el transporte, se puede utilizar con otros métodos combinados en la producción de alimentos de humedad intermedia. Sin embargo, los consumos de energía utilizados en los procesos de deshidratación y los tiempos de secado son importantes. Por tal motivo se realizó un análisis comparativo del tiempo de secado en vegetales, contrastando el método convencional contra tratamientos previos de las muestras antes del secado para reducir el gasto energético. Se utilizó chile habanero, jalapeño, serrano y poblano, las muestras fueron tratadas con ondas ultrasónicas a baja frecuencia y movimientos ultrarrápidos tipo vórtex, la temperatura óptima de secado se fijó en 80 °C. Las muestras se sometieron a tratamiento ultrasónico durante 5, 10 y 15 min y secadas a 80°C, hasta alcanzar peso seco y constante, el peso se analizó cada hora. Para el tratamiento vórtex, se sometieron las muestras a movimientos ultrarrápidos durante 5, 10 y 15 minutos y se secaron a 80°C hasta alcanzar peso seco y constante. Las muestras control solamente fueron secadas a 80° C hasta alcanzar peso seco y constante. Los chiles que se trataron con ultrasonido alcanzaron un peso seco en 20 horas, mientras que los chiles tratados con vórtex alcanzaron un peso seco en 25 horas; mientras que las muestras control alcanzaron el peso seco entre 30 a 40 horas. Esto que los tratamientos ultrasónicos y vórtex aplicados previos a la deshidratación pueden disminuir los tiempos de secado y por ende la cantidad de energía utilizada en el proceso.

INTRODUCCIÓN

El secado de los alimentos es uno de los métodos más antiguos que existen para realizar la conservación de los alimentos. El proceso de secado consiste en la extracción del agua que se encuentra contenida en los alimentos utilizando medios físicos hasta que el nivel del agua sea adecuado para su conservación durante periodos largos. Cuando la humedad final que se busca está por debajo de la humedad del aire normal o del medio ambiente, es necesario realizar un proceso controlado de secado, utilizando aire caliente que provenga de una fuente de energía solar, eléctrica o por combustión de madera u otros derivados del petróleo¹.

La reducción del contenido de humedad de los alimentos es una forma eficaz de evitar el desarrollo de microorganismos y así aumentar la vida y disponibilidad de los alimentos para el consumo. Este método ya se utilizaba en la prehistoria para conservar alimentos como higos y otras frutas. Otra ventaja del proceso de secado en la industria alimentaria es la reducción de peso que se consigue al deshidratar los alimentos y con ello la reducción de costes asociados al transporte².

Las aplicaciones del secado son muy variadas entre ellos están: permitir el empleo del producto seco en otros procesos o tratamientos, facilitar el manejo posterior del producto, reducir el peso del mismo con lo que se reducen los costos de embalaje y transporte, aumentar la capacidad de los aparatos, proteger los productos secos durante su almacenamiento y transporte y recuperar subproductos valiosos.

Actualmente se están generando nuevos procesos para la conservación de alimentos, uno de estos nuevos métodos es el uso de ondas ultrasónicas ya que permite la homogenización y emulsificación de sus ingredientes, la conservación al inactivar enzimas, el mejoramiento de la calidad sensorial y prolongar la vida útil de los alimentos.

ULTRASONIDO

Los procesos de ultrasonido se pueden clasificar en dos grandes grupos, los ultrasonidos de alta intensidad (UAI) y los de baja intensidad (UBI), en términos de conservación de alimentos el más utilizado es el UAI, que se usa comúnmente para la destrucción microbiana, mientras que los UBI se usan de manera frecuente para el diagnóstico médico.

El pre tratamiento ultrasónico es un método que consiste en colocar el alimento dentro del baño de limpieza de ultrasonido que ayuda a la destrucción microbiana, incremento de la transferencia de masa durante el secado, separación de membrana y mejoramiento de la extracción de compuestos³.

VORTEX

El pre tratamiento de movimientos ultrarrápidos (vórtex) es un método utilizado para la extracción de metabolitos y enzimas de células y para mezclar de modo intenso células de bacterias y levaduras⁴. Para comprobar la efectividad de los métodos aplicados a la conservación de alimentos es necesario realizar un análisis microbiológico para cuantificar los microorganismos presentes en el producto y para determinar la calidad higiénico-sanitaria de un proceso, así como también un análisis sensorial que permita evaluar, analizar e interpretar las características sensoriales del alimento⁵.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron dos pruebas control con el método convencional, la primera fue a 60°C/ 30 h y la segunda a 80°C/30 h para eliminar la humedad total de los chiles hasta llegar a un peso constante, para establecer la temperatura más adecuada para el secado sin que se llegaran a afectar las propiedades organolépticas de las muestras; se determinó que la temperatura más adecuada fue de 80°C; posteriormente se realizaron los pre tratamientos con el método Ultrasónico y Vórtex combinándolos cada uno con el método convencional para reducir el tiempo de secado.

Se realizó el secado de chiles mediante el método convencional de acuerdo al protocolo establecido por SAGARPA¹ donde se indica que el secado de chiles debe realizarse en hornos a temperaturas de entre 60 y 80°C/30-40 horas.

Para el método ultrasónico se pesan los chiles y se colocan en el sonicador durante distintos tiempos para posteriormente pesar y colocarlos en charolas e introducir al horno a 80°C/20 horas y monitorear hasta peso constante.

Para el método vórtex se pesan los chiles y se procede a tomar cada chile y ponerlos sobre el agitador vórtex y estar rotándolos para que el pre tratamiento sea homogéneo, posteriormente se introdujeron al horno a 80°C/25 horas y monitorear hasta peso constante.

RESULTADOS

Chiles	Tratamiento	Tiempo de tratamiento	Características
Habanero	Ultrasónico	1 min	Mantienen el tono de su color opaco, y con una superficie rugosa.
		3 min	Tienen un color opaco, superficie rugosa y están completamente secos.
Serrano	Ultrasónico	5 min	Presentan un color opaco por el tratamiento y están totalmente secos.
		7 min	Un color opaco y uniforme, con un aroma más intenso y superficie rugosa.
Jalapeño	Ultrasónico	10 min	Superficie rugosa, firme y con un tono opaco y un aroma intenso.
		15 min	Con un tono opaco y superficie rugosa, además de un aroma muy intenso.
		20 min	Superficie demasiado rugosa, con un color más oscuro y un aroma intenso.

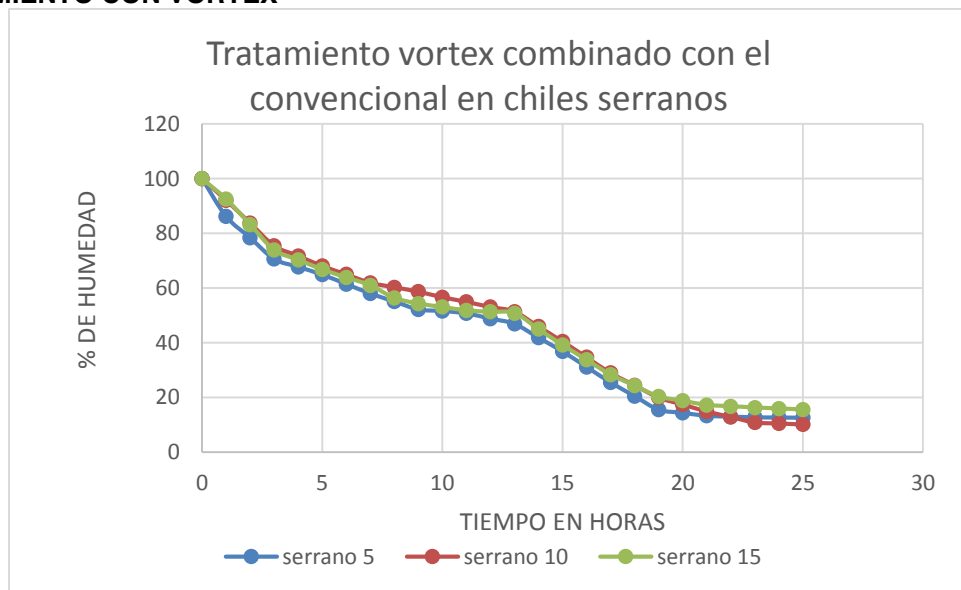
Tabla 1. Resultados del análisis sensorial de las muestras de chiles sometidos al pretratamiento Ultrasónico.

Chiles	Tratamiento	Tiempo de tratamiento	Características
Habanero	Vórtex	1 min	Tienen un color muy opaco y su superficie está más rugosa en comparación a los chiles del método ultrasónico.
Serrano		3 min	Color opaco, con unas zonas más oscuras debido al tratamiento con una superficie muy rugosa.
Jalapeño		5 min	El chile aparte de estar rugoso, esta mallugado en algunas zonas con un color no uniforme.
		7 min	Presenta rompimiento en algunas zonas y está muy seco y un poco quebradizo.
		10 min	Tiene una textura rugosa, un aroma intenso y con un color opaco no uniforme.
		15 min	De textura un tanto suave, superficie rugosa, color muy oscuro de algunas zonas y de otras más claro ya que no está completamente seco y aroma muy intenso.
		20 min	Textura muy rugosa, y aun con un poco de humedad y color muy oscuro.

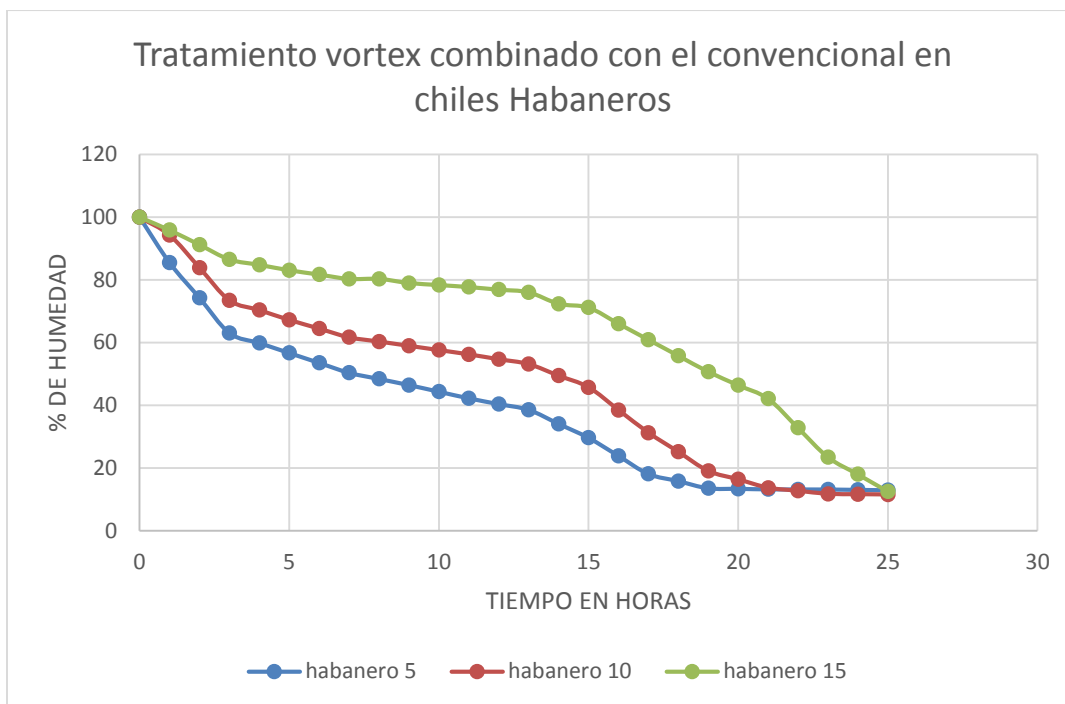
Tabla 2. Resultados del análisis sensorial de las muestras de chiles sometidos al pretratamiento Vórtex.

A continuación, se muestran en las gráficas 1 a 6 el comportamiento de los diferentes chiles expuestos a diferentes pre tratamientos y tiempos.

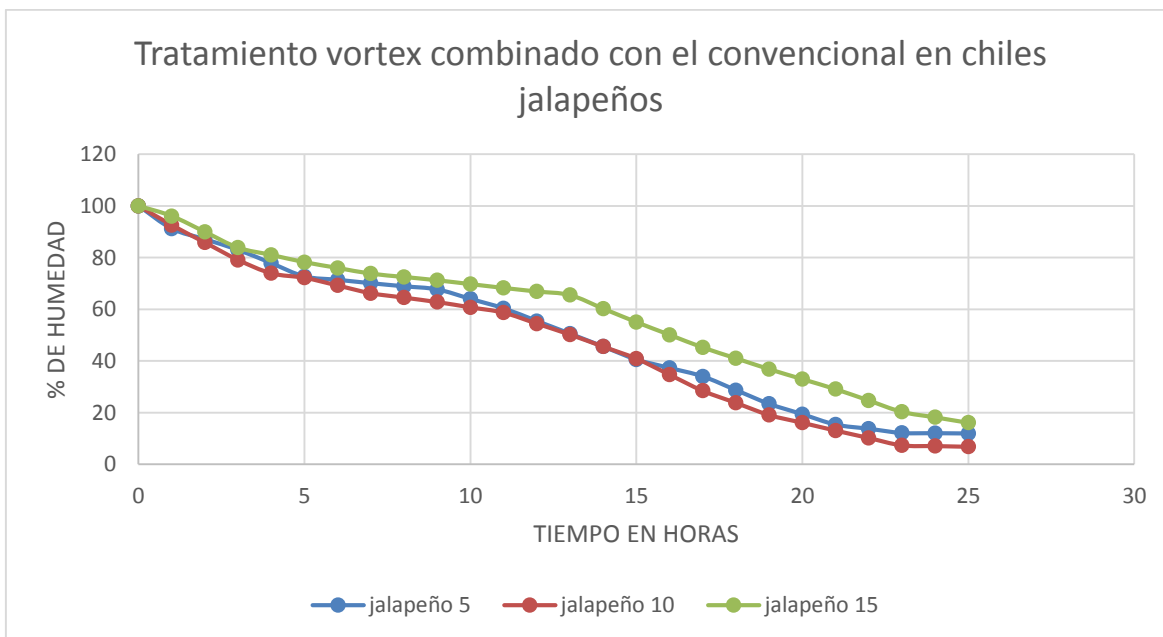
TRATAMIENTO CON VORTEX



Gráfica 1. Comportamiento del chile serrano pre tratado con vórtex

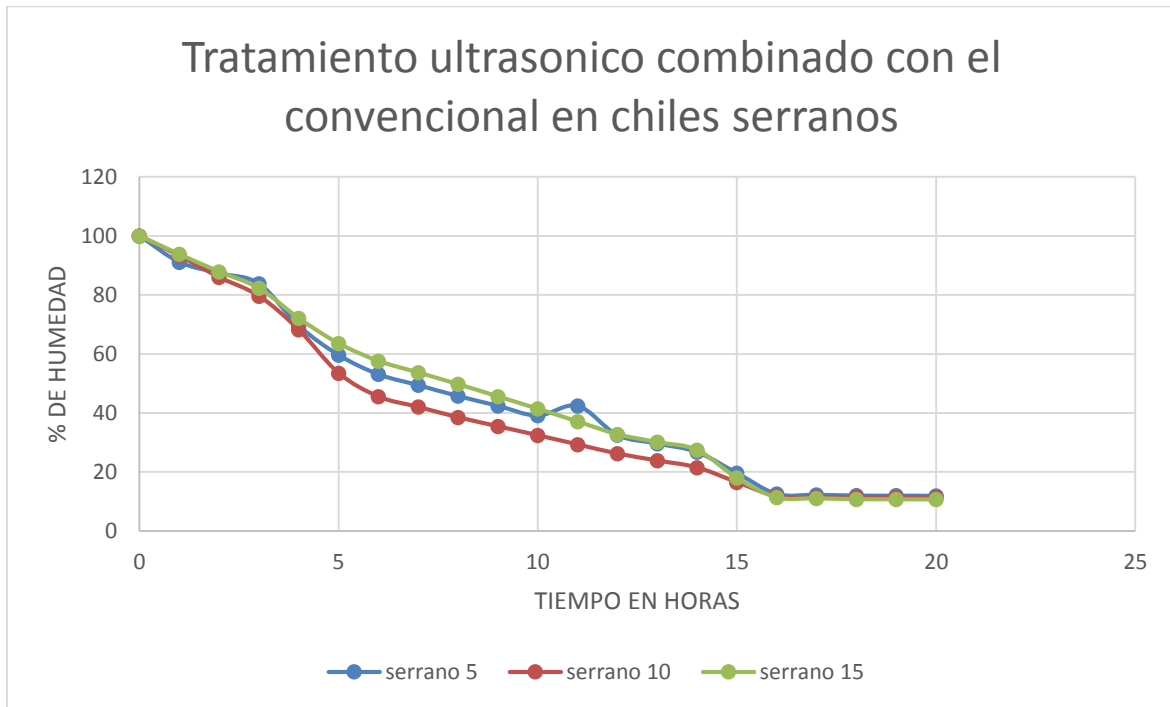


Grafica 2. Comportamiento del chile habanero pre tratado con vórtex

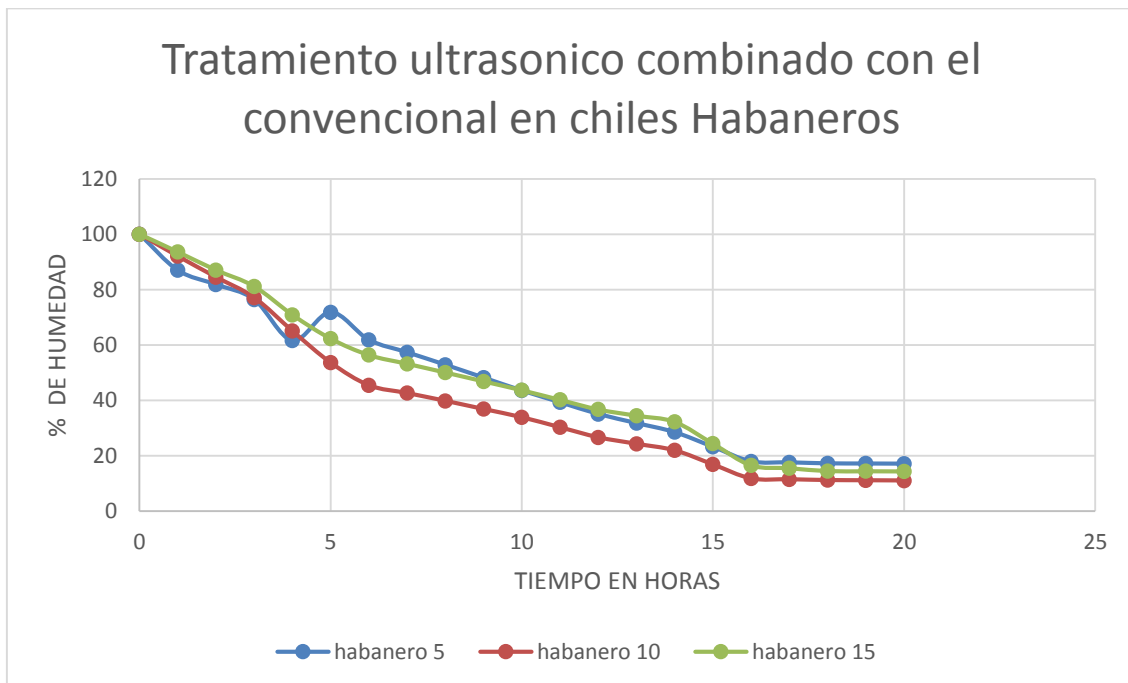


Grafica 3. Comportamiento del chile habanero pre tratado con vórtex

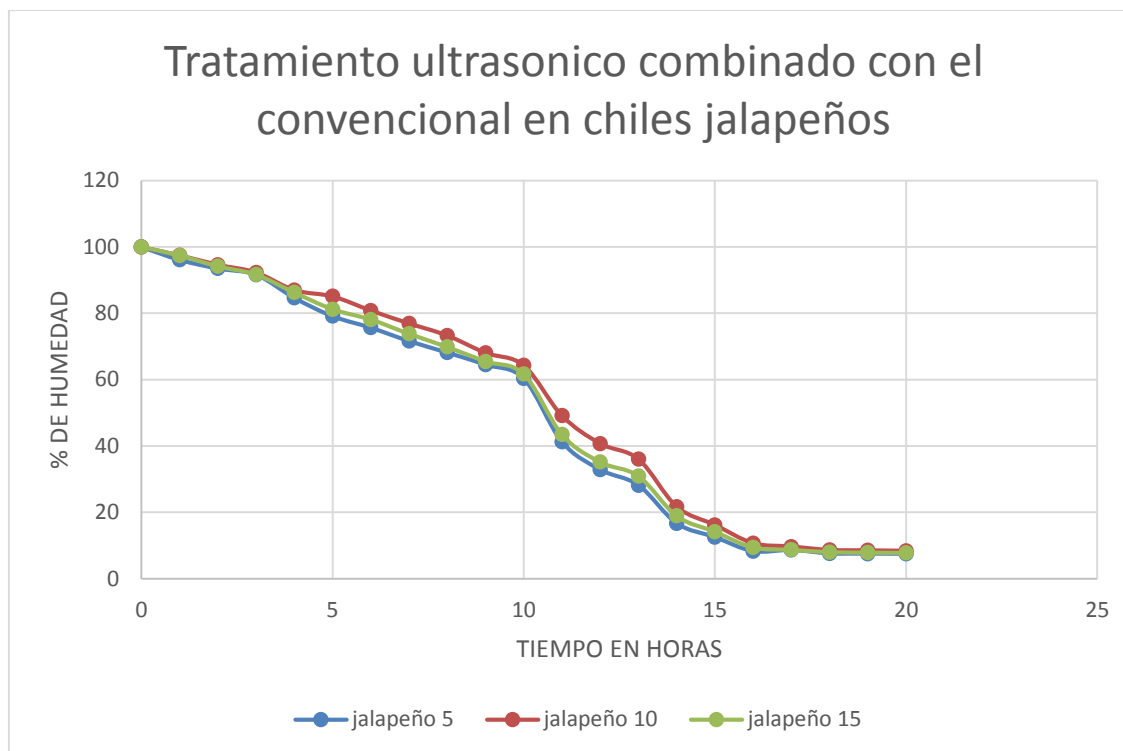
TRATAMIENTO CON ULTRASONIDO



Grafica 4. Comportamiento del chile serrano pre tratado con ultrasonido.



Grafica 5. Comportamiento del chile habanero pre tratado con ultrasonido.



Grafica 6. Comportamiento del chile jalapeño pre tratado con ultrasonido.

CONCLUSIONES

El empleo de los métodos y tratamientos térmicos para la conservación de alimentos con el uso de nuevas tecnologías ha cobrado mayor auge en los últimos años. Las tecnologías en alimentos buscan satisfacer las necesidades del consumidor para obtener productos frescos y con características nutrimentales y de inocuidad adecuados. Se demostró que al aplicar los métodos ultrasónicos y vórtex como tratamientos previos a la aplicación del método convencional para secar los distintos tipos de chile, se reduce de 10 a 15 horas el tiempo de secado en comparación con el uso únicamente del método convencional, que además del ahorro en el tiempo de secado también representa un ahorro energético.

Con el análisis de las características sensoriales y porcentaje de humedad que se eliminó mediante el uso de métodos ultrasónicos, vórtex y convencional nos permiten inferir que esta es una tecnología viable para su aplicación a nivel industrial y de esta manera reducir tiempos de producción, costos y una mayor y mejor calidad del producto, como perspectiva del proyecto, se plantea el análisis del daño celular y valor nutricional ocasionado por los métodos convencionales de secado y su comparación con los tratamientos previos de ultrasonido y vórtex.

BIBLIOGRAFÍA

1. SAGARPA. (2006). *Tecnología de producción de chile seco*. México: Instituto Nacional de investigadores forestales, agrícolas y pecuarios.
2. ACERINOX. (2015). Secado industrial de alimentos. Obtenido de: <https://www.acerinox.com/es/noticias/tsnoticia/Secado-Industrial-de-alimentos/>
3. Gómez, J. & López, A. (2009). Aplicaciones del ultrasonido en el tratamiento de alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 59-73
4. Biosan. (03 de 08 de 2017). *Agitador vortex multiple*. Obtenido de Manual de funcionamiento certificado: <http://biosan.lv/files/1120/V-32%20-%20Manual%20de%20funcionamiento.pdf>
5. H.Zumbado. (2002). *Análisis químico de los alimentos*. Universidad de la habana: Instituto de farmacia y alimentos.

6. NMX-F-255-1978. MÉTODO DE CONTEO DE HONGOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS. METHOD OF TEST FOR COUNT OF FUNGI AND YEAST IN FOOD. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

PROLIFICIDAD Y TASA DE SOBREVIVENCIA EN HÁMSTER SIRIO DORADO BAJO DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA

Demetrio Alonso Ambríz García¹, José Roberto Vázquez Avendaño¹, Bárbara Vargas Miranda², Alfredo Trejo Córdova¹, María del Carmen Navarro Maldonado¹

¹Departamento de Biología de la Reproducción. ²Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Correo electrónico: deme@xanum.uam.mx

RESUMEN

En los bioterios, es importante obtener la mayor eficiencia en los parámetros productivos y reproductivos de las especies que ahí se mantienen, para efectos de calidad de la investigación que con ellos se realice, así como para los aspectos de economía. La alimentación es pieza fundamental en este proceso. De manera reciente, el aumento en el precio de este insumo, así como los estudios que se han realizado con distintas fórmulas alimenticias, lleva a buscar alternativas acordes a las necesidades particulares. El objetivo de este trabajo fue, determinar el efecto sobre la prolificidad y la tasa de sobrevivencia al destete de las crías, en hembras hámsteres sirio dorado del bioterio de la UAM-Iztapalapa que fueron sometidas a diferentes niveles de proteína en la dieta. Se utilizó alimento comercial Abene, con dos niveles de proteína (23 y 28%). Se analizaron los resultados de 22 partos, partiendo de hembras de 2 meses de edad y 120 gr de peso promedio, a las que se les permitió alcanzar 3 partos. Las hembras fueron apareadas con machos de 3 meses de edad y peso promedio de 120 gr, con una vida media reproductiva de 1 año. La prolificidad al parto en las hembras, fue similar para ambos niveles de proteína en la dieta (8.5 y 7.9 crías respectivamente, $p > 0.05$). En tanto que la sobrevivencia de las crías al destete, fue significativamente mayor para las madres alimentadas con niveles de 28% de proteína en la dieta (2.9 vs. 5.2 crías respectivamente, $p < 0.05$). La eficiencia en la obtención de crías destetadas fue de 34 y 66%, respectivamente. Se concluye que el nivel de proteína en la dieta influye principalmente en la tasa de sobrevivencia de las crías.

INTRODUCCION

Desde que se incluyó al hámster Sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), como animal de bioterio hacia 1930 en Jerusalén, las condiciones de alojamiento y manejo fueron similares a las utilizadas para la rata y el ratón, sin embargo dado que existen entre especies, datos biológicos sustancialmente diferentes las consecuencias no se hicieron esperar. Así por ejemplo, la rata y ratones son animales que forman poblaciones numerosas con una interacción social intensa y cercana, con patrones de cópula entre varios machos con varias hembras (tipo promiscuo) y lactancias colectivas, en tanto que el hámster es un animal que naturalmente prefiere la vida aislada, solo interactuando socialmente en dos momentos, con el macho durante la cópula y con sus crías durante la lactancia individual. Además es ampliamente reconocido que el hámster tiene un patrón repetitivo de canibalismo preferentemente de la madre hacia las crías y su nivel de agresión es alto cuando dos individuos adultos se encuentran en un espacio común (Schneider y Wade, 1989).

Si bien el hámster ha ganado un gran como mascota, la condición de canibalismo de la madre hacia las crías, habitual en esta especie, es algo que afecta emocionalmente a los dueños de los mismos, procurando entonces limitar el acercamiento de géneros o incluso el que no gesten ni paran.

Otra característica interesante del hámster es que las hembras han conservado parte de la diferencias de las glándulas secretoras de la próstata del macho, a nivel de cérvix y esta secreción se produce de manera abundante durante el proestro y estro, sirviendo como un importante atractivo sexual al macho, quien están constantemente en tránsito en el territorio en búsqueda esa secreción aromática para interactuar sexualmente con hembras que además en esa condición de ciclo estral son receptivas y subordinadas temporalmente a la actividad del despliegue copulatorio del macho. Pasada esa etapa la hembra es agresiva pudiendo matar a la pareja (Cajas, 2015).

La condición de canibalismo se ha estudiado intensamente por los científicos, dado que es una característica propia de esta especie. Sirva aclarar que en otras especies como rata, ratón, coneja, cerda, perra, gata, el que una madre consuma a sus crías es considerada como una conducta atípica y aberrante, en tanto que en la hembra hámster es una conducta bien establecida. En las

diferentes especies mencionadas las madres recurren al canibalismo como una manera de aberración de la conducta materna. Algunas de estas hembras caníbales repetirán la conducta durante los partos sucesivos por lo que no tendrán utilidad como reproductoras, esta conducta de canibalismo se encuentra ligada a factores estresores que la detonan haciendo que la madre salga del control pacífico y dedicado que supone la conducta materna para con sus crías que lleva si a presentar un fuerte instinto de defensa para protección de la camada en relación a los depredadores como prueba del instinto de conservación (Schneider y Wade, 1989).

En las hámsteres la conducta de canibalismo se intercala con la de habilidad materna, de manera que una hámster en un momento de lactancia con la tranquilidad que supone esto, selecciona a alguna de las crías bajo de ella y la atrae hacia su hocico para consumirla, en tanto las demás crías continúan amamantándose. Esto ha llamado poderosamente la atención de los científicos quienes han estudiado intensamente esta curiosa conducta de canibalismo en comunión con la de la conducta materna (Hashimoto, *et al.*, 2001).

De estos estudios ha derivado que también existen factores estresores que pueden detonarla como el sentirse constantemente perturbada, por constante observación, como el carecer de las condiciones de cama de la calidad y abundancia necesaria, como la interacción social no deseada, y la carencia de agua.

Por otro lado los alimentos de bioterio han sufrido aumentos considerables de precios, los cuales están directamente relacionados con el nivel de proteína de los mismos. La variante básica es que los alimentos para hembras y machos reproductores utilizan mayor nivel de proteína dada los requerimientos nutricionales, en contraparte con los que solo están en condiciones de crecimiento o de mantenimiento, el nivel proteico requerido es inferior.

El papel de dietas maternas con altos o bajos niveles de proteínas en la salud de las crías ha sido estudiada principalmente en animales (Zambrano et al 2006). Dietas con bajo o alto nivel de proteínas durante la gestación influyen el peso corporal, metabolismo y regulación del consumo en las crías (Sasaki et al., 1982)

Por otro lado es conocido que la gestación es una etapa de anabolismo con ganancia de peso para la madre, y que la lactancia es catabólica, teniendo la necesidad de movilizar grandes cantidades de reservas nutricionales que no pueden ser solventadas con los ingredientes consumidos en el alimento, entrando en lo que se conoce como balance metabólico negativo (Beery y Zucker, 2012). Con la finalidad de conocer el efecto del nivel de proteína en la dieta (23 y 28%) sobre la prolificidad y sobrevivencia de las crías es que se realizó el presente trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron hembras hámster vírgenes de 2 meses de edad y 120 gr de peso promedio. Se hizo un seguimiento de sus ciclos estrales a través de la Secreción Vaginal Postovulatoria (SVPO) durante 12 días para evidenciar sus ciclos regulares. También se utilizaron 3 machos de 3 meses de edad y 120 gr de peso promedio con experiencia sexual y fertilidad comprobada

Condiciones del bioterio

Las hembras y machos estuvieron en cajas de acrílico de 19x29x14 cm con una tapa-rejilla, alojados de manera individual. Contaron con un bebedero automático y con alimentación sobre la rejilla de pellets comerciales Abene. La temperatura promedio fue de 23°C, humedad relativa del 60% y fotoperiodo de 14 hr luz (4am-6pm) con 200 lux y 10 hr de oscuridad. Las cajas tuvieron cama de viruta que se cambió dos veces por semana, exceptuando cuando había crías recientes, donde se evitó el cambio y con ello perturbar a las madres.

Apareamientos y Partos.

Al tercer día después de la secreción postovulatoria las hembras fueron llevadas a la presencia del macho para la cópula. Se confirmó la presencia de espermatozoides a través de impronta o citología vaginal y verlos directamente al microscopio. Se realizó diagnóstico de gestación a los 7 días y se esperó el parto al día 16 de gestación.

Revisión de las crías.

Cada mañana se revisó la condición y cantidad de crías presente, durante los primeros días del parto, cuando se estableció la formación de la fuente de calor dentro del nido, las crías fueron separadas para contarlas utilizando un lápiz en tanto que la madre se distraía y estimulaba dándole

a un lado semillas de girasol. Cuando las crías rompieron la fuente de calor y se dispersaron se contaron de manera directa. Al día 21 se realizaron los destetes, se dio posteriormente 7 días de descanso a la madre y se volvió a revisar la SVPO durante un ciclo y se programó el apareamiento.

Alimentación.
El Abene (7100), está recomendado para roedores en mantenimiento y se sugiere administrarlo con restricción para evitar engordarlos. El nivel de Proteína es de 23% mínimo, Grasa 4.5% min, Fibra 6.0% máximo, Cenizas 8.0% max, Humedad 12.0% max y Extracto Libre de Nitrógeno (Carbohidratos) 4.5%. Utiliza en su composición maíz, sorgo, trigo, gluten de maíz, salvados de maíz, trigo, arroz y salvadillo, harinas de alfalfa deshidratada molida, soya, cártamo, ajonjolí, carne y pescado, melaza de caña, sal, carbonatos de calcio y ferroso, ortofosfato de calcio, aceite vegetal, DL-metionina, L-lisina, óxidos de magnesio, manganeso y zinc, cloruros de potasio y cobalto, sulfatos ferroso y de cobre, selenito de sodio, iodato de calcio, vitaminas A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12, cloruro de colina, pantotenato de calcio, niacina, ácido fólico y biotina. Además se formuló un alimento especial a 28% de proteína para tratar de salvaguardar la pérdida de crías en el periodo de balance metabólico negativo. Durante la primera parte del estudio las hembras recibieron el alimento bajo en proteína y durante la segunda etapa el alto. En ambos casos como dieta única.

Análisis Estadísticos

Con los datos obtenidos de prolificidad y sobrevivencia de las crías bajo dos niveles de proteína en la dieta se hicieron comparaciones a través de un análisis de t-Student con nivel de significancia de $p > 0.05$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

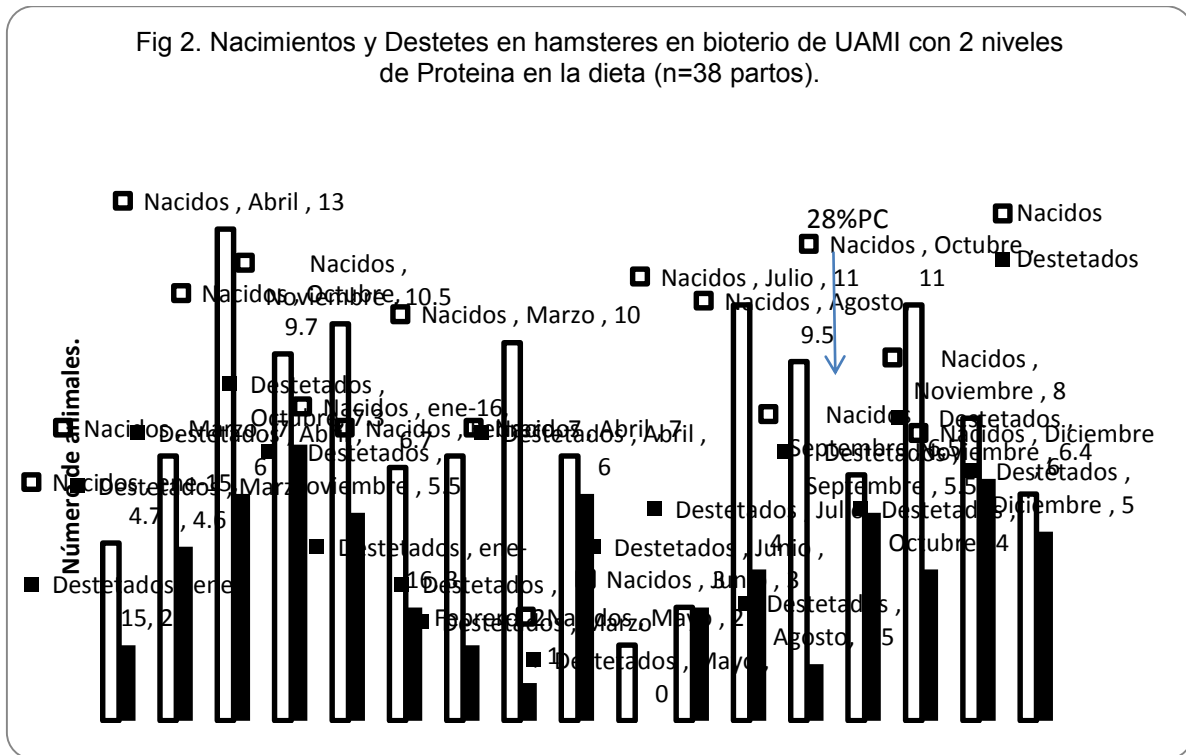
En las condiciones ambientales establecidas en el bioterio, las hembras hámster ciclan de manera constante y los machos tienen libido intenso. Prácticamente la totalidad de las hembras son de ciclos regulares y cuando son jóvenes la fertilidad es cercana al 100% en el primer apareamiento. Cuando ya han tenido uno o más partos basta hacer un seguimiento de la ciclicidad y colocarlas pocos días después del destete con los machos para que haya receptividad sexual. Cuando transcurre un intervalo considerable entre el destete y el apareamiento la receptividad es reducida.

Fig 1. Durante la lactancia se presenta un balance metabolismo negativo



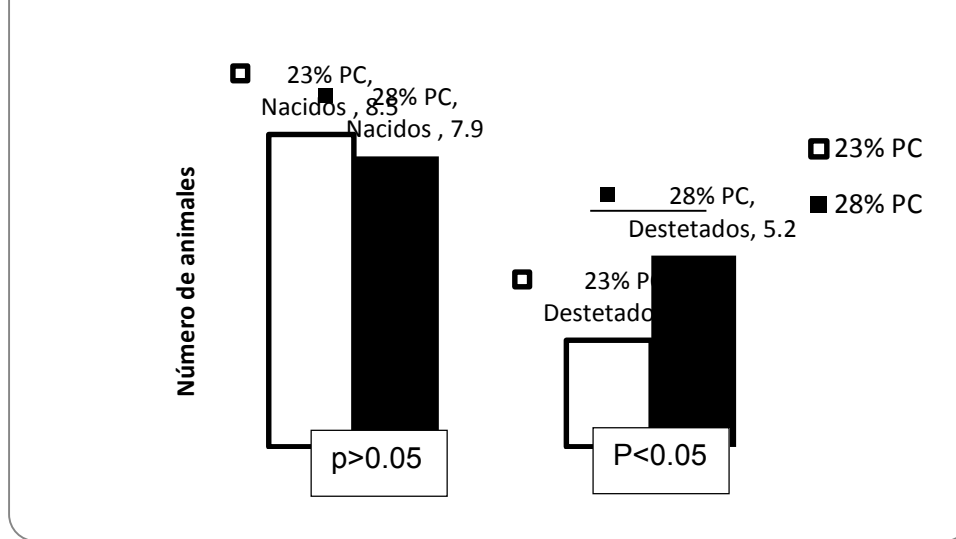
En la figura 2 se aprecia que la mayoría de los partos analizados ocurrió en la dieta de 23% de proteína (enero a agosto) en tanto que la dieta a 28% de proteína fue de septiembre a diciembre. En este tiempo se analizaron 38 partos, siendo superior el número de crías nacidas en relación a las destetadas en ambos tipos de nivel de proteína

Fig 2. Nacimientos y Destetes en hamsteres en bioterio de UAMI con 2 niveles de Proteína en la dieta (n=38 partos).



Se observa además en la dieta al 23% de proteína, la dispersión entre el número de nacidos, desde el valor mayor de 13 crías hasta el más bajo de 2 crías. Y que la mayor parte de los partos fueron arriba de 6 crías. Los destetes están con mucha frecuencia por debajo de los valores de nacimientos llegando en el mejor de los casos a ser del 90% de los nacidos, pero en ocasiones hasta el 10% de ellos. Al dar la dieta al 28% de proteína sigue apreciándose la variabilidad entre el número de nacidos pero los destetados tienden a ser más que en el nivel de proteína anterior, siendo frecuente el tener cerca del 80% de destetados. Este comportamiento puede apreciarse de mejor manera en la figura 3, donde se han agrupado los datos por meses según el nivel de proteína en la dieta. Se aprecia que a 23% y 28% de proteína no hubo diferencia estadísticamente significativa en nacidos, sin embargo al comparar los destetados si mostró diferencia estadísticamente significativa, siendo mayor el número de los destetados de las madres que estuvieron recibiendo dieta con 28% de proteína (5.2 vs 2.9 crías), demostrando que es importante aumentar el nivel de este nutriente para lograr mayores tasas de destete. Durante el trabajo no se encontraron crías muertas o restos de éstas, lo que indica que fueron consumidos por sus madres en acto de canibalismo.

Fig 3. Nacimientos y Destetes en hámsteres en bioterio con 2 niveles de Proteína en la dieta (n=22 partos).



Es importante considerar que no solo es importante el nivel de proteína de la dieta sino también la fuente de la misma, por ejemplo Altamirano, en 2016, comparó dos dietas para crecimiento de hámster donde la fuente fue harina de pescado o pasta de soya. El mejor resultado al crecimiento, conversión y costo de producción, fue con la dieta con proteína de harina de pescado. Este mismo autor señala que la cantidad de proteína requerida, estará en relación a la etapa fisiológica del animal y podrá ir desde 15 hasta 25%. Por su parte Cajas en 2015, reportó sus resultados al alimentar a hámsteres durante el crecimiento y mantenimiento en una dieta basada en harina de lombriz como fuente de proteína a un nivel de 16% de proteína cruda.

CONCLUSIONES

La variación en proteína en la dieta (23 y 28%), no generó cambios en la prolificidad de las camadas, sin embargo si lo hubo diferencias en la sobrevivencia de las crías, donde al 28% de proteína, sobrevivieron significativamente más crías, indicando que el aumento de la proteína colaboró con el balance metabólico materno y en consecuencia, con duplicar tasa de sobrevivencia.

BIBLIOGRAFIA

1. C.M. Altamirano. 2016. Evaluación de dietas proteicas de origen animal y vegetal en la eficiencia productiva del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Tesis FMVZ. Universidad Técnica de Ambato. Ciencias Agropecuarias. Ecuador.
2. E. Cajas. 2015. Evaluación de una dieta a base de harina de lombriz en la alimentación del hámster ruso en la ciudad de Latacunga. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador.
3. A.K. Beery, I. Zucker. 2012 Sex ratio adjustment by sex-specific maternal cannibalism in hamsters. *Physiol Behav.* 107(3):271-6.
4. H. Hashimoto, TR., Saito, N. Moritani, K Komeda, KW. Takahashi.. 2001. Comparative study on isolation calls emitted from hámster pups. *Exp. Anim.* 50(4):313-8
5. JE. Schneider, GN. Wade. 1989. Effect of maternal diet, body weight and body composition on infanticide in Syrian hamsters. *Physiol Behav* 46(5):815-21.
6. E. Zambrano, CJ. Bautista, M. Deás, PM. Martínez-Samayoa, M. González-Zamorano, H. Ledesma, J. Morales, F. Larrea, PW. Nathanielsz. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth

- and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol.* 2006 Feb 15; 571(Pt 1):221-30.
7. A. Sasaki, I. Nakagawa, M. Kajimoto. Effect of protein nutrition throughout gestation and lactation on growth, morbidity and life span of rat progeny. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1982 Oct; 28(5):543-55.

PELLET MULTINUTRICIONAL PARA ALIMENTACIÓN DE MANTENIMIENTO EN HÁMSTER SIRIO DORADO EN EL BIOTERIO

Demetrio Ambríz García¹, Pablo de la Cruz Mendoza², Bárbara Vargas Miranda³, Alfredo Trejo Córdova⁴, María del Carmen Navarro Maldonado⁵

^{1,4,5}Departamento de Biología de la Reproducción. ²Licenciatura en Producción Animal, ³Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa deme@xanum.uam.mx

RESUMEN

Los costos de alimentación en animales de bioterio, han aumentado considerablemente, además en algunas localidades es complejo acceder a marcas o fórmulas específicas, por lo que existe la necesidad de utilizar otro tipo de suministros. Los bloques multinutricionales contienen los elementos necesarios para satisfacer los requerimientos nutritivos de los animales. Para su preparación se usan harinas o migajas, utilizando como adherente cemento, cal o ambos. El pellet es un minibloque nutricional (PMN). Con la finalidad de estudiar el efecto de un PMN elaborado a partir de alimento industrial de pollo (61.3%), melaza (9.2%), cal (11.1%) y cemento (18.4%); durante el mantenimiento de hámster se llevó a cabo el presente trabajo. Se utilizaron dos grupos de 6 machos adultos cada uno. Grupo experimental (GE) llevó un periodo de adaptación de dos semanas (50% PMN y 50% Nutricubos Abene), posteriormente recibieron solo PMN (100%). El grupo control (GC) recibió 100% Abene. Fueron pesados al inicio y cada dos semanas del experimento durante 6 semanas, tanto el alimento como los animales. El GE tuvo una reducción de peso de 7% en la adaptación (124 vs 115 gr, $p>0.05$). Con un consumo menor al GC (5.9 vs 6.6 gr respectivamente, $p>0.05$) En dieta 100% PMN, el GE tuvo una reducción de peso del 15% (115 vs 98 gr, $p<0.05$) en tanto el GC mantuvo su peso (103 gr), Además el consumo fue menor en el GE que en el GC (3.7 vs 5.5 gr, respectivamente, $p>0.05$). Se concluye que este PMN puede ser incorporado satisfactoriamente hasta en un 50% de la dieta del hámster durante mantenimiento.

INTRODUCCIÓN

Los bioterios son necesarios para la generación de información relacionada con la investigación en diferentes áreas del conocimiento. En ellos, se mantienen animales en las mejores condiciones posibles para lograr su óptimo mantenimiento y reproducción, requeridos para los adecuados resultados de la investigación.

Como en otras áreas de este quehacer, los insumos requeridos en el bioterio dependen de las fluctuaciones de mercados nacionales e internacionales, razón por la cual en ocasiones tienden a aumentar considerablemente poniendo en riesgo la continuidad de las actividades. Esto aunado a las complicaciones económicas nacionales que ha llevado en un lapso de 3 años una reducción del 30% en el presupuesto público destinado para Instituciones de Educación Superior complica aún más la situación. De ahí la necesidad de buscar alternativas para la continuidad de las actividades científicas.

Además cabe señalar que la producción y distribución de alimentos especializados para animales de bioterio es restringida, de tal manera que en muchos lugares apartados de nuestro país, donde se hace investigación y se tienen bioterios, no necesariamente se tiene la disponibilidad de dicho insumo (Cajas, 2015; Altamirano 2016). Por lo que con frecuencia se tiene que optar por alimentos sustitutos que reúnan las características de los requerimientos nutricionales así como de tener la presentación física requerida, por ejemplo en el caso en el que los animales sean mantenidos en cajas de acrílico con tapas de rejilla, donde el alimento colocado en la parte superior debe tener el tamaño indicado para no caer al interior de la caja, que si bien los animales podrían consumirlo, también puede contaminarse con excreta u orina y generar problemas digestivos. Es importante considerar en el caso de los roedores que el pellet debe tener la dureza tal que permita el desgaste de los incisivos que son de crecimiento continuo en estas especies.

Es importante considerar que existe una importante presión social sobre los bioterios por la demanda hacia el buen trato animal, así como la reducción al mínimo del número de animales para pruebas biológicas y de investigación, para lo cual existe una rigurosa normativa, nacional, estatal e institucional, para garantizar que las actividades desarrolladas en el bioterio sean de gran

observancia, minuciosas y de gran contenido ético, lo que es vigilado estrictamente en las instituciones dedicadas a estos fines.

Por otro lado, es ampliamente conocido que el costo de alimentación en animales de abasto es el principal rubro del costo total de producción, llegando en ocasiones al 70 u 80% de éste (García *et al.*, 2012). La formulación y elaboración de alimentos para animales de bioterio es complejo debiendo cuidar detalles tales como el origen y adecuada conservación de la materia prima, los suplementos a adicionar, la mezcla de los mismos, formación de pastillas, comprimidos o pellets, así como los contenedores y los tiempos de caducidad, para evitar al máximo la contaminación o descomposición de los mismos y con ello generar una afectación a los animales (Altamirano, 2016).

En general los roedores de bioterio (ratones, ratas, hámsteres, jerbos y cuyos) son organismos altamente sensibles a los cambios de dieta o a la contaminación de la misma y dado que todos ellos llevan procesos de digestión y fermentación en un prominente ciego que poseen, los cambios alimenticios pueden originar en poco tiempo eventos catastróficos (García *et al.*, 2012).

Con la finalidad de evaluar el consumo de un pellet multinutricional elaborado de manera sencilla y accesible, en la dieta de hámsteres en mantenimiento es que se realizó el presente trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron dos grupos de 6 machos hámsteres Sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) adultos de 6 meses de edad y 100-120gr gr de peso promedio. Se rasuraron para identificación individual. Fueron mantenidos en cajas de acrílico medianas con medias de 30x45x20cm con tapas de rejilla. En condiciones estándar de bioterio con temperatura a 23°C, humedad relativa del 60%, fotoperiodo de 14 horas luz (4am-6pm)/10 oscuridad. Se proporcionó agua fresca y alimento pelletizado (Abene) a libertad. Cada animal fue identificado a través de rasurado para un seguimiento individual.

Evaluación de consumo de alimento

Durante dos semanas se pesó el alimento pelletizado proporcionado y el remanente para conocer el consumo grupal e individual. El alimento comercial Abene (no. 7100) tiene un costo al mayoreo de 35 pesos/kg y tiene una composición de 23% mínimo de proteína, 4.5% mínimo de grasa, 6% máximo de fibra, 8% máximo de cenizas, 12% máximo de humedad y 46.5% de extracto libre de nitrógeno. El tamaño del pellet fue de 5/8 de pulgada de pulgada de diámetro y 1 pulgada de largo.



Fig 1. Pesaje de Pellets Multi Nutricionales

Preparación de Pellets multinutricionales (PMN)

Se adquirió alimento comercial para pollo de engorda a 9 pesos /kg al menudeo, en presentación de migaja, con la siguiente composición: 20% mínimo de proteína, 4% mínimo de grasa, 4% máximo de fibra, 8% máximo de cenizas, 12% máximo de humedad y 52% de extracto libre de nitrógeno.

Se incluyó melaza como adherente y saborizante así como cemento y cal para formar los pellets. Se mezclaron los ingredientes en seco y posteriormente se agregó agua para disolverlos y que fraguara. Con ayuda de plástico se envolvió, formaron los pellets y presiono para comprimirlos. Se colocaron en un lugar caliente durante 7 días, a que secan y se almacenaron hasta su uso.



Fig 2. Administración de los Pellets Multi Nutricionales sobre la tapa-rejilla de la caja.

La composición y el costo de kg de los Pellets Multi Nutricionales, elaborados fue el siguiente:

INGREDIENTE	INCLUSIÓN %	PRECIO(\$) /Kg	PRECIO(\$)
Alimento de pollo	61.3	9	5.52
Cemento	18.4	25	4.60
Melaza	9.2	10	0.92
Cal	11.1	8	0.89
TOTAL	100		11.93

Evaluación del consumo de Pellets multinutricionales.

Esto se realizó en dos etapas. En la primera de ellas, al grupo experimental le fue administrado PMN en 50% de la dieta y el restante 50% pellets Abene. En la segunda fase este grupo recibió PMN al 100%. El grupo control estuvo consumiendo solamente pellets Abene. Se registró el consumo diario y el peso de los animales durante cuatro semanas.

Análisis Estadísticos

Tanto los pesaje de alimento consumido, como las pesos de los animales fueron comparados entre los grupos control y experimental a través de una prueba de t-Student con un nivel de significancia de 0.05

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la primera etapa del trabajo, se determinó que los hámsteres consumen en promedio 5.44 gr de alimento por individuo y por día, con un intervalo de 4.18 a 6.17gr.

Al administrar los PMN durante dos semanas al 50% con el alimento que normalmente consumían (Abene), el GE mostró aceptación por el PMN. No se presentó rechazo al alimento siendo consumido por igual. No se presentaron problemas digestivos y la dureza del mismo se calificó como adecuada considerando la revisión al fondo de la caja debajo del depósito de alimento de la tapa-rejilla donde se encontró en la misma medida polvillo de ambos tipos de alimento. Sin embargo fue notorio que los animales redujeron su peso promedio de 124 a 115 gr (9gr) que representaron una disminución del 7% del peso corporal. El consumo promedio diario de alimento puede 5.9gr, que fue estadísticamente similar al del grupo control ($p > 0.05$).

Gpo Exp	Peso inicial	Peso final	Diferencia
1	117	110	-7
2	125	115	-10
3	130	120	-10
4	127	118	-9
5	120	110	-10
6	127	117	-10
Promedio	124	115	-9 (p>0.05)*

*En relación a peso promedio inicial y final.

El GC por su parte, tuvo una reducción de peso más modesta de solo 2 gr, durante dos semanas de evaluación, al pasar de 105gr de peso promedio a 103. Lo que representó una disminución del peso corporal del 2%. El consumo diario promedio de alimento fue de 6.6 gr.

Gpo C	Peso inicial	Peso final	Diferencia
1	110	106	-4
2	106	108	2
3	106	107	1
4	92	88	-4
5	103	102	-1
6	110	109	-1
Promedio	105	103	-2 (p>0.05)*

*En relación a peso promedio inicial y final.

Con respecto a la administración de PMN al 100% se redujo considerablemente el consumo de alimento en el GE con apenas 3.7 gr por día, lo que representó el 63% del consumo del experimento previo con los PMN al 50%, y siendo significativamente diferentes comparado con el del GC en esta etapa (5.5 gr, p<0.05), lo que repercutió en el peso promedio, pasando de 115 gr de peso promedio al inicio de la prueba a 98 gr al final de esta al cabo de dos semanas, lo que representó una disminución del 15% del peso corporal, lo que se aprecia el siguiente cuadro:

Gpo Exp	Peso inicial	Peso final	Diferencia
1	110	93	-17
2	115	99	-16
3	120	102	-18
4	118	101	-17
5	110	95	-15
6	117	99	-18
Promedio	115	98	-17 (p<0.05)*

*En relación a peso promedio inicial y final.

El peso de los animales control, que solo consumieron pellets Abene, en este experimento se conservó durante las dos semanas. El consumo promedio individual fue de 5.5 gr, lo que representó el 83% de lo consumido en la etapa anterior.

Gpo C	Peso inicial	Peso final	Diferencia
1	106	109	3
2	108	106	-2
3	107	105	-2
4	88	90	2
5	102	101	-1
6	109	107	-2
Promedio	103	103	0

Las variaciones en el consumo diario de alimento pelletizado Abene obtenidas durante la primera etapa del trabajo (de 4.18 a 6.17 gr) muestran la amplitud de variación biológica que tuvieron los animales en este parámetro registrado. Las causas pueden ser diversas, sin embargo es importante recordar que las condiciones ambientales dentro del bioterio tienden a ser uniformes en cuanto a temperatura, humedad, fotoperiodo y velocidad del viento, sin embargo existen más factores como interacción social, estados anímicos, ciclicidad en el caso de las hembras, presencia de aromas o ruidos específicos de otros animales o incluso de otros investigadores (García *et al.*, 2012), de ahí, el reforzamiento de procurar mantener un ambiente ordenado, en calma y en lo posible lejos de estímulos mencionados que pueden inducir variaciones biológicas. La variación detectada aquí, corresponde a casi 2 gr, lo que representa una variación de 48% considerando el límite inferior y de 32% con el límite superior. Pero los datos son inferiores considerando lo propuesto por Altamirano, 2016 que señala de 8 a 15 gr por individuo por día.

En relación a la elaboración del pellet fue algo accesible en la integración de los ingredientes y el moldear la condición física final del alimento, los cuales permanecieron durante el tiempo de experimentación sin mostrar cambios en su conformación o en crecimiento de patógenos. Esto es especialmente importante por no requerir maquinaria especializada (García *et al.*, 2012). Los animales lo consumieron de manera adecuada en un 50% de la dieta, lo que permite un ahorro sustancial en el costo del alimento pero complica la aplicación en el objetivo de poder ser utilizado como alimento único en bioterios donde no es accesible conseguir (por costo o disposición) alimentos especializados.

Los animales del GE, al término del presente trabajo, regresaron a la dieta de 100% de pellets Abene sin que presentaran trastornos digestivos que complicaran su salud, lo que nos indica que los pellets multinutricionales no representaron un riesgo digestivo para los animales, sin embargo al proveerlo al 100% de la dieta, la reducción en el consumo y en peso corporal indicaron que no es conveniente proporcionarlos de esa manera, requiriendo una formulación más especializada.

Finalmente comentar que el costo del PMN (11.93 pesos/kg) fue apenas el 34% del costo del alimento Abene, lo que puede representar un ahorro considerable.

CONCLUSIONES

Es posible la inclusión de los pellets multi nutricionales elaborados a partir de la base de alimento para pollo, melaza, cemento y cal, en la dieta de mantenimiento de hámster machos, proporcionándolos al 50% como máximo y conservando otro 50% de alimento especializado. Esto reduce costos de producción y de mantenimiento.

BIBLIOGRAFIA

1. Altamirano S.C. 2016. Evaluación de dietas proteicas de origen animal y vegetal en la eficiencia productiva del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Tesis MVZ. Universidad Técnica de Ambato. Cevallos. Ecuador. Pp 80.
2. Cajas R. E. 2015. Evaluación de una dieta a base de harina de lombriz en alimentación del hámster ruso, en la ciudad de Latacunga. Tesis MVZ, Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga Ecuador. Pp 67.
3. García, D.E., Cova, L.J., Briceño, S., Scorza D., J.V., Montilla, F., Medina, M.G, Perea, F. y González, D. 2012. Metabolitos nitrogenados en el hámster dorad alimentado a base de harina de lombriz (*eisenia* spp). *Arch. Zootec.* 61 (234): 163-174.
4. Laverde C.V. 2013. Evaluación de dietas proteicas de origen animal y vegetal en la eficiencia productiva del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Tesis Ingeniero Comercial. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador. Pp 188.

ELABORACIÓN DE UNA PASTA ENRIQUECIDA CON UNA HARINA DE NOPAL PARA PERSONAS CON SINDROME METABÓLICO

Andrea Liliana Carbajal Chávez, Rosa María García Martínez, Nelio Pastor Gómez.

Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología.

RESUMEN

Existe una preocupación por problemas de salud en el país, cada vez aumenta el consumo de la comida rápida, la cual no aporta calidad nutricional, generando enfermedades. Es de importancia la generación de productos que brinden efectos funcionales a la salud del consumidor. Buscando aprovechar la gran variedad de productos perecederos de nuestro país, y teniendo en cuenta que el nopal por sus aspectos agrícolas es una buena alternativa y que su consumo está asociado a controlar diferentes desordenes metabólicos. Tiene un alto contenido de fibra, siendo una característica que más ha llamado la atención. El objetivo de este proyecto es presentar una pasta con alto valor nutritivo formulada a partir de harina trigo y harina de nopal a diferentes concentraciones, contribuyendo a mejorar características organolépticas, nutrimentales y reológicas dando origen a un producto de calidad y con grandes beneficios funcionales dirigidos a la población diabética principalmente. Se determinó el análisis proximal del nopal *Opuntia ficus indica* en base fresca y deshidratada, mediante la tecnología propuesta en el AOAC. Como resultado de este análisis, destaca la cantidad de fibra alimentaria que se cuantificó en nopal deshidratado con un 47.65%. Se elaboró la pasta a diferentes concentraciones de trigo-nopal teniendo en cuenta una formulación base de pasta, seguida de una evaluación posterior mediante pruebas sensoriales con panelistas inexpertos. La pasta 70%T/30%N fue la de mayor aceptación. Concluyéndose que es posible fortificar una pasta de harina de trigo con nopal, manteniendo las características organolépticas y las características finales como producto terminado en condiciones aceptables, además de que al utilizar la harina de nopal se incrementa el valor nutrimental comparado contra una pasta de grado comercial y que es una alternativa saludable para la población en general y haciendo énfasis para aquellas personas que sufren de síndrome metabólico.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, existe una gran preocupación por los problemas de salud presentes en el país, cada vez aumenta el consumo de la llamada comida rápida, la cual no aporta calidad nutricional siendo que su contenido calórico es muy alto, generando sobrepeso, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes. Es de importancia la generación de productos alimenticios que brinden efectos funcionales a la salud del consumidor. En busca de aprovechar la gran variedad de productos perecederos de nuestro país y teniendo en cuenta que el nopal por sus aspectos agrícolas es una buena alternativa para el desarrollo de productos agroindustriales. El consumo de nopal está asociado a controlar desordenes como la obesidad, padecimientos gastrointestinales como el estreñimiento y úlceras gástricas, ayuda a reducir los niveles de colesterol y glucosa en sangre. Además, tiene un alto contenido de fibra, tanto soluble como insoluble; siendo esta última una de las características del nopal que más ha llamado la atención. El objetivo de este proyecto es el de incrementar el valor nutritivo de la pasta con harina de nopal a la formulación base a diferentes concentraciones, dando origen a un producto de calidad y con beneficios funcionales dirigido a la población diabética principalmente.

TEORÍA

La medicina está orientada tanto a la salud individual como a la salud pública en general. Las actividades de la salud pública son la protección de la salud, promoción de la misma, prevención de la enfermedad y restauración de la salud. La prevención se puede clasificar en primaria, secundaria y terciaria. La primaria es la más importante dado que en ese momento el individuo se encuentra sano y para conseguir que se siga cumpliendo éste objetivo deberá cumplir con una dieta completa y equilibrada promoviendo consumo de frutas y verduras, así como de tener actividad física regular. Hoy en día, existe una gran preocupación por los problemas de salud presentes en el país, ya que cada vez aumenta el consumo de la llamada comida rápida y chatarra, la cual normalmente no aporta

calidad nutricional siendo que su contenido calórico es muy alto, vía grasas y azúcares, generando sobrepeso, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes.

Es de importancia la generación de productos alimenticios que brinden efectos funcionales a la salud del consumidor. En busca de aprovechar la gran variedad de productos pericardios de nuestro país y teniendo en cuenta que el nopal por sus aspectos agrícolas es una buena alternativa para el desarrollo de productos agroindustriales.

En la actualidad, la mala alimentación y el deficiente consumo de fibra han provocado un aumento de diversas enfermedades. La fibra como elemento nutricional va mucho más allá de su poder para regular la función intestinal, ya que posee funciones biológicas muy importantes para la prevención de un gran número de enfermedades tal como la colitis, cáncer de colon y recto, constipación, hemorroides, divertículos, diabetes, y trastornos metabólicos como obesidad, etc. También se tiene reporte que disminuye la concentración de triglicéridos, colesterol y glucosa sanguínea.

Se denomina pasta a los alimentos preparados mezclados con harina, agua, sal, huevo u otros ingredientes. Cualquier harina sirve para este propósito, generalmente se emplea el *Triticum durum*, aunque también se usa la harina de alforfón o de arroz. Se pueden añadirse otros ingredientes de manera opcional como las verduras y hortalizas para adición de color, así como de suplementos de proteínas con la finalidad de tener una pasta de mayor contenido nutrimental.

Las pastas alimenticias son productos no fermentados, que se obtienen por el empaste y amasado de sémola, semolina o harina de trigo mezcladas con agua y el agregado de colorantes, sal, huevo fresco o en polvo, con la finalidad de obtener una masa firme y homogénea. Luego se extruye bajo fuerte presión dando productos con diversas formas, fideos, tubos, cintas, espirales, etc. Posteriormente se hacen secar hasta que el contenido de humedad llegue alrededor del 11%. El secado debe ser lento, con la finalidad de que sea parejo y no se produzcan fisuras en el producto terminado pero también lo suficientemente rápido para que no haya la proliferación de hongos y levaduras. Durante el amasado se produce la formación de gluten, que se caracteriza por ser muy cohesivo, debido a que se utilizan harinas de trigo duro que permiten una buena retención del líquido incorporado. La red de gluten no tiene volumen debido a que no se utilizan agentes fermentables, puesto que la finalidad de la masa no es desarrollo de la extensibilidad sino el predominio de la cohesión.

Las pastas secas presentan un aspecto brillante, deben ser duras y quebradizas. Mientras que, las pastas frescas se elaboran con ingredientes similares pero a las cuales se les puede añadir algún tipo de conservador para evitar el ataque de los microorganismos que suelen crecer a actividades de agua relativamente altas.

La cocción de las pastas tanto secas como frescas, debe hacerse con abundante agua, durante este tiempo de cocción se gelatiniza el almidón, coagulan las proteínas y se manifiesta aumento de peso y volumen debido a la absorción de agua, variable según el tipo de pasta.

El nopal, *Opuntia ficus indica*, es una cactácea endémica del continente americano y es parte esencial de la cultura mexicana. México posee el 68% de la diversidad de dicha planta. El nopal aporta en 100gr a la ingesta diaria recomendada (IDR) cantidades considerables de calcio, magnesio, manganeso, potasio, vitaminas y minerales.

En general, el consumo de nopal se encuentra asociado a controlar desordenes como la obesidad, padecimientos gastrointestinales como el estreñimiento y úlceras gástricas, ayuda a reducir los niveles de colesterol y glucosa en sangre. Además, tiene un alto contenido de fibra, tanto soluble como insoluble; siendo esta última una de las características del nopal que más ha llamado la atención.

La fibra está constituida por los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales entre los que destacan la celulosa, la hemicelulosa, ligninas y las pectinas. La fibra se clasifica en dos tipos: la fibra insoluble, que tiene la capacidad de hinchamiento al absorber agua lo cual provoca que aumente el volumen de la materia fecal provocando un incremento en los movimientos peristálticos del intestino y facilitando la defecación; y la fibra soluble que forman soluciones viscosas de gran volumen por lo cual reduce el tiempo de estancia de sustancias dañinas para el cuerpo, eliminándolas a través de las heces fecales.

En este trabajo, se pretende modificar la formulación base de una pasta e introducir harina de nopal para generar un alimento funcional, es decir, un producto de adquisición común en el mercado y de uso familiar cotidiano pero que brinde al consumidor efectos benéficos de gran importancia tal como

la integración de fibra dietética en la formulación de producto terminado como un factor nutricional con una característica funcional y que posea además las características químicas, físicas, sensoriales y de tipo reológico que marca la Norma como producto terminado para que tenga un grado de mayor aceptación entre la población en general, y por otro lado el bajo costo de la materia prima siendo que México es el primer productor de nopal, lo hace una excelente opción.

PARTE EXPERIMENTAL

Se determinará el análisis proximal al nopal basándose en la Metodología descrita en el AOAC, lo cual incluye los siguientes parámetros:

- Determinación de humedad, método 934.01 de la AOAC (1990). Norma técnica de referencia NMX-F083-S-1986.
- Determinación de cenizas, método 962.02 de la AOAC (1990). Norma técnica de referencia NMX-F-607-NORMEX-2002.
- Determinación de lípidos, método 920.85 de la AOAC (1997) y la Norma Técnica de referencia NMX-F-615-NORMEX-2004.
- Determinación de proteínas, método 920.87 de la AOAC y la Norma Técnica de referencia NMX-F-068-SA
- Determinación fibra dietética, metodología Prosky et al., 1998.
- Determinación de carbohidratos, por diferencia.
- Norma Oficial Mexicana NOM. F-23-S-1980, Pasta de harina de trigo y/o semolina para sopa y sus variedades.

Se realizará el secado y molienda de los cladidos de nopal para la obtención del harina. Se establecerán formulaciones base de pasta con diferentes concentraciones de harina trigo-harina de nopal de acuerdo a la formulación base para preparación de pasta, a fin de evaluar la concentración idónea tanto de mejor aceptación a nivel sensorial mediante pruebas sensoriales con escala hedónica, como aquellas consideraciones propias de la pasta, que garanticen las propiedades como producto terminado que debe reunir la pasta de acuerdo a las normativas establecidas. Se determinará la tabla de valor nutrimental de la formulación obtenida con mayor grado de aceptación.

RESULTADOS

Tabla 1. Análisis Bromatológico de Nopal Fresco *Opuntia ficus indica*

Humedad	94.2312 %
Ceniza	1.111 %
Lípidos	0.4143 %
Proteína	0.6821 %
Fibra alimentaria	2 %

Tabla 2. Análisis Bromatológico de Nopal Deshidratado

Humedad	5.78 %
Ceniza	21.0442 %
Lípidos	2.4901 %
Proteína	10.013 %
Fibra Alimentaria total	47.65 %
Fibra Insoluble	42.8 %
Fibra Soluble	4.85 %

El análisis sensorial se realizó mediante el uso de una escala hedónica, y usando panelistas inexpertos, 30 personas. Este análisis se hizo con la finalidad de probar el grado de aceptación del producto obtenido. Posteriormente se volvió a evaluar el producto terminado transcurrida una semana, y con una población de 30 panelistas para ver el grado de aceptación o rechazo del producto. Parámetros: color, olor, sabor, textura, flavor

Para iniciar el análisis proximal, las pastas enriquecidas con nopal deshidratado (opuntia ficus indica, variedad milpa alta o nopal verdura) las cuales se eligieron, 70/30 y nuestra pasta control, por pruebas sensoriales con paneles de degustación de 30 personas, se trituraron en un molino con la finalidad de reducir el tamaño de partícula.

Tabla 3. Análisis Bromatológico de Pasta Enriquecida con Nopal ST 70%- SN 30%

Humedad	8.69 %
Ceniza	3.86 %
Lípidos	0.6933 %
Proteína	12.65 %
Ganancia de peso	156.144%
Perdida de almidón	4.7752%
Sedimento	22.238%
Tiempo de cocción	34 min.

Tabla 4. Análisis Bromatológico de Pasta Control Marca Italtapa 100% Harina de Trigo

Humedad	7.255 %
Ceniza	0.83 %
Lípidos	0.525 %
Proteína	6.2325 %
Ganancia de peso	42.02 %
Perdida de almidón	1.5537 %
Sedimento	15.110 %
Tiempo de cocción	30 min.

CONCLUSIONES

Es posible fortificar una pasta de harina de trigo con nopal sin alterar significativamente las características organolépticas del producto final comparadas con un producto de pasta de harina de trigo normal. Aumenta el contenido nutrimental entre una pasta normal y una enriquecida, las pastas enriquecidas podrían ser una de las alternativas para las personas con problemas de síndromes metabólicos.

Es de importancia la generación de productos alimenticios que brinden efectos funcionales a la salud del consumidor. En busca de aprovechar la gran variedad de productos perecederos de nuestro país y teniendo en cuenta que el nopal por sus aspectos agrícolas es una buena alternativa para el desarrollo de productos agroindustriales.

En general, el consumo de nopal se encuentra asociado a controlar desordenes como la obesidad, padecimientos gastrointestinales como el estreñimiento y úlceras gástricas, ayuda a reducir los niveles de colesterol y glucosa en sangre.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Association of Cereal Chemists (1983). Approved Methods of the AACC. Method 16-50. Approved November 1989. The Association: St. Paul, MN.
2. Anzaldúa Morales, A. (2000) La evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. p. 24 – 45
3. Escuela Latinoamericana de Molinera (Eslamo). (2006). Curso de Pastificación Nivel Avanzado. Puerto Cabello. Venezuela.
4. Badui, D. S. 2006 Química de los Alimentos. 4 Edición. Pearson. México, DF. PP 633-648.
5. Kill, R. C. y Turnbull, K. 2001. Tecnología de la elaboración de pasta y sémola. ACRIBIA. Zaragoza, España. Pp. 3-11, 228-234

EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOCOLESTEROLEMICO DE UNA BEBIDA A BASE DE *TENEBRIO MOLITOR* L.

Florencia del Carmen Salinas Pérez, Aristeo Garrido Hernández, Maribel Sánchez Díaz, Alejandro Gutiérrez Rivera y Lorena Elizabeth Chávez Güitrón, Irnychavez@yahoo.com

Universidad Tecnológica de Tecámac

RESUMEN

México tiene el primer lugar en adultos, (72.5%), ENSANUT 2016, este problema es debido en su mayoría a cuestiones de alimentación. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto hipocolesterolemico de una bebida funcional a partir de larvas de *Tenebrio molitor* L. Se formaron 5 grupos de 3 personas, que participaron de forma voluntaria. En 4 de los grupos se administró por vía oral una vez al día durante 10 días la bebida, cuya composición fue: A) larvas de *Tenebrio molitor* L. criadas en un sustrato de avena, manzana deshidratada y hojuelas de avena B) larvas de *Tenebrio molitor* L. criadas en un sustrato de salvado, manzana deshidratada y avena c) bebida con avena d) bebida con manzana deshidratada y el grupo control se le administró por vía oral agua purificada. La asignación de los participantes a cada grupo fue aleatoria. Las variables evaluadas fueron: colesterol total inicial mg/dL, colesterol total final mg/dL y disminución de colesterol mg/dL. La evaluación estadística se realizó con ANOVA de una sola vía y Tukey para la diferencia de medias. Los niveles de colesterol total mg/dL al inicio fueron: A 280.01±113.34, B 216.14±2.12, C 323.82±37.78, D 304.48 ±24.72 y el grupo control 315.42±16.376. Los niveles de colesterol final total fueron: 169.08±69.57 para A, 148.93±1.88 para B, 227.73±36.35 para C, 212.91±22.91 D y 314.6±16.82 para el control, existió diferencia significativa entre grupos A y B con el grupo control ($p<0.05$). En cuanto a la disminución de colesterol total en el A fue de 110.92±48.83, B 67.20±4.0, C 96.19±6.80, D 91.57±1.81 y control 1.32±0.25, los grupos A, B, C y D tuvieron una mayor disminución del colesterol que el grupo control ($p<0.01$). La bebida a base de *Tenebrio molitor* L. demostró tener efecto hipocolesterolemico.

INTRODUCCIÓN

El colesterol es una sustancia que se encuentra en el organismo, es un componente fundamental de las membranas celulares y resulta esencial para la división celular, es necesario para la elaboración de ácidos biliares y síntesis de hormonas. A los altos niveles de colesterol se le denomina hipercolesterolemia que representa un factor de riesgo de algunas enfermedades cardíacas. La hipercolesterolemia se produce cuando la presencia de colesterol en sangre está por encima de los niveles considerados normales (200 mg/dl) y si estos niveles persisten altos por periodos prolongados generan problemas (Castro-Juárez et al., 2018).

En México se ha identificado a través de estudios realizados que existe una alta prevalencia de hipercolesterolemia, ya que el 44.5% de la población mayor de 20 años ha sido diagnosticado al menos en una ocasión con niveles de colesterol elevados (INEGI, 2016). Escobedo de la Peña et al., 2014 encontraron que existe una relación entre la edad y los niveles de colesterol, ya que la población entre 55 y 64 años reportó niveles de colesterol promedio de 216.5 mg/dl.

Por lo anterior se requiere implementar políticas de salud orientadas a disminuir los factores de riesgo cardiovascular y de obesidad.

Uno de los insectos comestibles es la larva de *Tenebrio molitor* L., la cual aporta un alto contenido proteico y además aporta ácidos grasos insaturados, calcio, fósforo y algunas vitaminas. (Díaz Consuelos, 2018).

Una de las principales problemáticas que se tienen que atender en México es la obesidad y las enfermedades cardiovasculares que impactan en los años de vida saludable. Lozano et al., 2013 demostraron que algunos de los factores de riesgo que más afectan a los hombres son sobrepeso/obesidad; niveles de glucosa en sangre y presión arterial elevados y en las mujeres, el sobrepeso y la obesidad; glucosa elevada; hipertensión arterial; en ambos sexos, la dieta contribuye con 12% de pérdida de años de vida saludable.

Actualmente no existen estudios que demuestren que la larva de *Tenebrio molitor* L. se ha utilizado como una fórmula con efecto hipocolesterémico en la población mexicana adulta, por lo anterior

este proyecto plantea desarrollar y evaluar un suplemento alimenticio a base de larvas de *Tenebrio molitor* L para reducir los niveles de colesterol.

TEORÍA

El valor nutritivo de los insectos es elevado, estos tienen un alto contenido proteico, ya que las proteínas constituyen gran parte del cuerpo y son de buena calidad. También las grasas son un nutriente muy abundante en estos, sobre todo en los estadios larvarios (Ramos-Elorduy, 2004, Chávez-Güitrón et al., 2014). Además son ricos en algunas sales minerales y en vitaminas principalmente del grupo B (Ramos-Elorduy 2001). De forma general, se puede mencionar que el estado inmaduro, que es el que más se consume posee baja cantidad de fibra cruda, lo que unido al buen balance que poseen de los aminoácidos esenciales, hace que su digestibilidad in vitro e in vivo, sea elevada (Ramos-Elorduy, 2004, Ramos-Elorduy y Pino, 2005).

Bovera, et al., 2016, estudiaron el efecto de incluir larvas de *Tenebrio molitor* en pollo de engorda reemplazando la harina de soya y evaluaron el crecimiento, digestibilidad y características de canal. En este estudio la conversión alimenticia fue mayor con el grupo alimentado con las larvas, las características químicas de la canal no se modificaron y la longitud del intestino delgado y grueso fue mayor, por lo que la harina de estas larvas puede ser utilizada como una fuente alternativa proteica.

La base patogénica común a la mayoría de las enfermedades cardiovasculares, es la arteriosclerosis, esta enfermedad predispone a otros padecimientos que en algunos casos tienen consecuencias mortales. Entre estos se encuentran, infarto del miocardio, trombosis cerebral, entre otras enfermedades, en cuyo origen está implicada la hiperlipidemia, como factor de riesgo. Se ha encontrado que el consumo de ciertas plantas, afecta favorablemente el perfil lipídico al reducir las concentraciones de sus componentes. Por lo anterior existen algunos investigadores que se han interesado por desarrollar suplementos alimenticios como bebidas funcionales que tengan efecto hipolipemiente.

Pezo, 2011 demostró que una bebida elaborada a base de alpiste *Phalaris canariensis* L, saborizada con jugo de maracuyá y pasteurizada en una dosis de 1.64 ml, tuvo un efecto de disminución de colesterol y triglicéridos en ratas Wistar hipercolesteroleémicas en estado inducido.

Vizconde, 2015 estudio el efecto del extracto hidroalcohólico de semillas de *Phalaris canariensis* L, alpiste, en dosis de 0.1mg/kg y 0.2mg/kg para disminuir la hiperlipidemia inducida en ratas, *Rattus rattus albinus*, raza Holsman y observó que el extracto no modificó la hiperlipidemia inducida en ratas.

Anaya Medina, 2017 observó que el extracto acuoso de semillas de alpiste (*Phalaris canariensis* L) y linaza fue evaluado en personas con hiperlipidemia para determinar su efecto hipolipemiente. En este estudio se demostró que las medias de los niveles séricos de colesterol y triglicéridos al término del estudio son significativamente menores respecto a los valores iniciales concluyendo que el extracto posee efecto hipolipemiente.

Existen otros estudios, como el de Jolelem et al., 2011 quienes evaluaron el efecto del aguacate para la reducción del nivel de colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos y colesterol hepático en ratas Wistar hipercolesteroleémicas durante 30 y 60 días. En diferentes porcentajes de administración del aguacate (15 y 25. La dieta de 15% durante 30 días redujo los niveles de colesterol total y LDL.

El *Tenebrio molitor* L. ha sido utilizado para la alimentación de aves sin que cause problemas de mortalidad y toxicidad; además de que se ha demostrado que es una fuente alimenticia alta en proteína (Bovera, et al., 2016; Chávez-Güitrón, 2014). Sin embargo, no existen estudios que demuestren que estas larvas tengan efecto hipolipemiente, por lo anterior este estudio propone la evaluación del efecto hipocolesteroleémico de larvas de *Tenebrio molitor* L.

PARTE EXPERIMENTAL

Reproducción y recolección larvaria.

Consistió en la reproducción de *Tenebrio molitor* L. en etapa larvaria en un sustrato de avena. Las larvas se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: 27°C, humedad relativa del 80% y 16 horas de iluminación

Deshidratado y molido de las larvas de *Tenebrio molitor* L.

1. Se seleccionaron 100 larvas de *Tenebrio molitor* L de 5 cm de largo.

2. El deshidratado de las larvas de *Tenebrio molitor* L. se realizó en estufa a una temperatura de 70°C durante 2 minutos.
- 3.-El molido de las larvas se realizó en un mortero de porcelana. Las larvas deshidratadas y molidas se conservaron en frascos estériles y herméticos de vidrio.

Determinación de colesterol total

Se determinó el colesterol total de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA22002, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. Para la determinación del colesterol total se utilizó el kit Spinreact, dicha técnica se describe a continuación.

Colesterol total.

- 1- Se extrajo la muestra de sangre en pacientes en ayunas en un tubo vacutainer y tiempo de reposo por 2 minutos.
- 2- Se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos.
- 3.-Tres tubos o cubetas espectrofotométricas se identificaron como: B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido)
- 4- Posteriormente en el tubo para el blanco de reactivo se colocaron 1 mL de reactivo para prueba de colesterol y 10 µL de agua destilada.
- 5- En el tubo del estándar se agregaron 1 µL de reactivo para prueba de colesterol y 10 µL del estándar, este tubo se considerara como estándar de la prueba.
- 5- Posteriormente en los tubos de las muestras de los pacientes se colocaron 1 µL del reactivo para la prueba de colesterol y 10 µL del suero de la muestra.
- 6- En seguida se agitaron en vortex cada tubo por 30 segundos y se incubaran a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 7- La lectura se realizó en el espectrofotómetro a 515 nanómetros ajustando a cero con el tubo blanco de reactivo preparado previamente y se registraron los datos de la lectura de cada muestra.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La malteada funcional de 150 mL se administró durante diez días entre las 8:00 y 9:00 de la mañana. Se formaron cinco grupos experimentales, de tres pacientes, cada uno: : A) larvas de *Tenebrio molitor* L. criadas en un sustrato de avena, manzana deshidratada y avena B) larvas de *Tenebrio molitor* L. criadas en un sustrato salvado, manzana deshidratada y avena c) bebida con avena y d) bebida con manzana deshidratada y el grupo control se le administró por vía oral agua. Los pacientes fueron invitados en la Universidad Tecnológica de Tecámac a participar en este estudio y firmaron un documento de consentimiento informado, que incluía la información que se requería para participar y la libertad de retirarse en cualquier momento del estudio, además de informarles que los datos se manejarían de forma confidencial. Los pacientes incluidos fueron de ambos sexos y tenían una edad entre los 24 y 72 años, estos se distribuyeron de forma aleatoria en los diferentes tratamientos. El nivel sociocultural de los participantes se encontraba en individuos que forman parte de las clases media baja y media alta. Se tomaron dos muestras sanguíneas a cada paciente al inicio y al final del tratamiento. Las muestras se obtuvieron en tubos vacutainer nuevos, demostrándole al paciente la unidad nueva en su empaque. La muestra fue identificada en el momento de la toma de la misma. Se realizó un diseño en bloques, debido a la variabilidad en la edad de los pacientes. Las variables evaluadas fueron: colesterol total inicial mg/dL, colesterol total final mg/dL y disminución de colesterol mg/dL. La variable independiente en este estudio fueron los tratamientos y la dependiente es el efecto de los tratamientos en la disminución del colesterol total en sangre (mg/dL), El análisis estadístico que se utilizó fue un ANDEVA y para evaluar la diferencia de medias se realizó una prueba de Tukey, utilizando como software STATISTICA 7.0 for Windows.

RESULTADOS

Los niveles de colesterol total mg/dL (Tabla 1) al inicio fueron: A 280.01±113.34, el B 216.14±2.12, C 323.82±37.78, D 304.48 ±24.72 y el grupo control 315.42±16.376. Los niveles de colesterol final total fueron: 169.08±69.57 para A, 148.93±1.88 para B, 227.73±36.35 para C, 212.91±22.91 D y 314.6±16.82 para el control, existió diferencia significativa entre grupos A y B con el grupo control (p<0.05).

Tabla 1. Niveles de colesterol total en pacientes tratados con una bebida funcional (Mg/Dl)

	A	B	C	D	E
Colesterol inicial	280.01±113.34	216.14±2.12	323.82±37.78	304.48 ±24.72	315.42±16.376
Colesterol final	169.08±69.57 ^{ac}	148.93±1.88 ^{ac}	227.73±36.35 ^{ab}	212.91±22.91 ^{ab}	314.6±16.82 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

En cuanto a la disminución de colesterol total Tabla 2, en el A fue de 110.92±48.83, B 67.20±4.0, C 96.19±6.80, D 91.57±1.81 y control 1.32±0.25, los grupos A, B, C y D tuvieron una mayor disminución del colesterol que el grupo control ($p < 0.01$).

Tabla 2. Disminución de colesterol total en pacientes tratados con una bebida funcional (mg/dl)

	A	B	C	D	E
Disminución de colesterol total	110.92±48.83 ^a	67.20±4.0 ^a	96.19±6.80 ^a	91.57±1.81 ^a	1.32±0.25 ^b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.01$).

Actualmente no se conoce, el mecanismo por el cual, las fibras solubles producen una reducción en los niveles de colesterol total. Una de las hipótesis sugeridas en la literatura, es el incremento en la excreción de sales biliares o la disminución de la absorción del colesterol. Esto produciría una depleción del "pool" de sales biliares, provocando al mismo tiempo, un incremento en la utilización del colesterol en la síntesis de sales biliares, así como un incremento de los receptores LDL en el hígado (Fernández 1995, Marlett et al., 1995). También, además de lo anterior existiría una reducción de la síntesis de colesterol, por acción de los ácidos grasos de cadena corta, producidos por la fermentación de la fracción soluble de la fibra en el intestino grueso (Marlett et al., 1995).

CONCLUSIONES

La malteada funcional de *Tenebrio molitor* L, a base de avena y manzana deshidratada tiene un efecto hipocolesterolémico.

BIBLIOGRAFÍA

- Anaya, M. (2017). Efecto de la mezcla de cereales con extracto acuoso de *Ananás comosus* en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos de personas con dislipidemia. *SCIÉND0*, 20(2), p. 71-81.
- Bovera, F., Loponte, R., Marono, S., Piccolo, G., Parisi, G., Iaconisi, V., & Nizza, A. (2016). Use of *Tenebrio molitor* larvae meal as protein source in broiler diet: effect on growth performance, nutrient digestibility, and carcass and meat traits. *Journal of animal science*, 94(2), p. 639-647.
- Castro-Juárez, C. J., Cabrera-Pivaral, C. E., Ramírez-García, S. A., García-Sierra, L., Morales-Pérez, L., & Ramírez-Concepción, H. R. (2018). Risk factors for cardiovascular disease in Mexican adults. *Revista Médica MD*, 8(2), p 152-162.
- Chávez-Guitrón, L., Cerón-Montes, G., Olvera-Contreras, B., & Salinas-Pérez, F. (2014). Contenido proteico en larvas de *Tenebrio molitor* L. alimentadas con diferentes sustratos. *Universo de la Tecnología*, Alejandro Fonseca, p 21.
- Díaz Consuelos Guillermina Taygete (2018). Evaluación nutricional del grillo café (*Acheta domestica*), zophoba (*Zophobas morio*) y tenebrio (*Tenebrio molitor*), alimentados con tres diferentes sustratos. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Escobedo-de la Peña, J., Pérez, R., Schargrodsky, H., & Champagne, B. (2014). Prevalencia de dislipidemias en la ciudad de México y su asociación con otros factores de riesgo cardiovascular. *Resultados del estudio CARMELA*. *Gaceta médica de México*, 150(2), 128-136.

7. Fernández M. Distinct mechanisms of plasma lowering by dietary fiber in the guinea pig: specific effects of pectin, guar gum and psyllium. *J Lipid Res.* 1995; 36 (11): 2394- 2404.
8. INEGI 2016. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido (Internet). Disponible desde: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>. Fecha de acceso 06 de abril de 2018.
9. Salgado, J. M., Bin, C., Mansi, D. N., & Souza, A. (2008). Effect of the hass avocado (American Persea Mill) on hipercolesterolemic rats. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28(4), p. 922-928.
10. Lozano, R., Gómez-Dantés, H., Garrido-Latorre, F., Jiménez-Corona, A., Campuzano-Rincón, J. C., Franco-Marina, F., & Vos, T. (2013). La carga de enfermedad, lesiones, factores de riesgo y desafíos para el sistema de salud en México. *Salud Pública de México*, 55(6), p. 580-594.
11. Marlett J, Hosig K, Vollendorf N, Shinnick F, Haack V. Mechanism of serum cholesterol reduction by oat bran. *Hepatology.* 1994; 20(6):1450-1457.
12. Pezo, M. (2011). Elaboración de una bebida de alpiste (*Phalaris canariensis* L) y su aplicación en ratas con hipercolesterolemia inducida experimentalmente. *Portal de revistas científicas en ciencias de la salud*, 16, p. 836.
13. Ramos-Elorduy J, Pino JMM (2001) Contenido de vitaminas de algunos insectos comestibles de México. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 45: p. 66-76.
14. Ramos-Elorduy J (2004) La etnoentomología en la alimentación, la medicina y el reciclaje. En Llorente BJE, Morrone JJ, Yáñez O, Vargas IF (Eds.). *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México hacia una síntesis de su conocimiento*. Vol. 4. UNAM, México. pp. 329-413.
15. Ramos-Elorduy J, Pino MJM (2005) Catálogo del valor nutritivo de los insectos comestibles de México. Ciudad de México: Edición Especial del Instituto de Biología/UNAM. 40 pp.
16. Vizconde Rodríguez, A. P. (2015). Efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de semillas de *Phalaris canariensis* sobre la hiperlipidemia inducida en *Rattus rattus albinus*. Tesis de Licenciatura.

RESULTADOS EN EL CICLO DEL CULTIVO DEL AGAVE TEQUILANA (WEBER VAR. AZUL) CON LA APLICACIÓN DE ALGAENZIMS, TURBOENZIMS Y ALZINC EN EL MUNICIPIO DE ABASOLO GUANAJUATO.

Reyes Ríos D. M.¹; Canales López B.²; Cárdenas Palomo J.O.²; Salazar Solís E.¹;
Parra Negrete L.A.¹ y Rucoba García A.¹
doramrr@ugto.mx, dora_1579@hotmail.com

¹División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca. Universidad de Guanajuato.

²Palau Bioquim, S.A. de C.V. Saltillo Coahuila.

RESUMEN

Para los agricultores de *Agave tequilana*, el que se le presenten tecnologías sobre el majo del cultivo es favorable siempre y cuando se reduzcan los costos de producción, y aún más si esta está ligada a la disminución del ciclo de 6 o 7 años a 4 o 5. En trabajo se estableció en agosto del 2012 y la plantación alcanzó su madurez fisiológica y fue jimado en mayo del 2017. Se evaluó el efecto en varias dosis de Algaroot^{MR}, Algaenzims^{MR} y Alzinc^{MR} en uno y dos litros por ha⁻¹, en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Las aplicaciones fueron directamente al suelo y a la base de la piña, de forma manual con una aspersora tipo mochila, durante el periodo de lluvias. Las aplicaciones iniciaron al año de establecida la plantación y durante 4 años que duro el ciclo del cultivo. En este trabajo se está reportando los resultados hasta el tercer año, ya que la última medición no se realizó debido a que el productor jimó antes de la fecha programada. Los resultados obtenidos en el ANOVA para las variables físicas, área foliar, diámetro y altura de planta generaron una diferencia altamente significativa entre tratamientos y bloques con unos Coeficientes de Variación de 13.2%, 7.23% y 7.33% respectivamente. El tratamiento 2 respecto al control genero un incremento de 48% en área foliar, 36 % más de altura y 35.4% de diámetro.

Palabras Clave. *Agave tequilana*, fertilización orgánica, extractos orgánicos de algas marinas.

INTRODUCCIÓN

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). A principios de año del 2018, publica que en el 2017 se exportaron mil 389 millones de dólares de mezcal y tequila. La superficie del cultivo del agave, en el 2017 llegó a más de 105 mil 600 hectáreas las cuales se encuentra mecanizadas, más de la mitad cuenta con tecnología aplicada a la sanidad vegetal, lo que permite elaborar bebidas como el tequila y mezcal, que son reconocidas a nivel internacional y que cuentan con denominación de origen.

El cultivo del maguey tequilero, conocido también como agave azul o *Agave tequilana weber* (nombre científico de esta planta), es la especie más utilizada como materia prima para la obtención del tequila. Actualmente, las Agaváceas son empleadas para la producción de inulina, jarabes, mezcal, sotol, bacanora, diversos destilados de agave como el tequila, papel, biocombustibles (etanol, hidrógeno, biogás), entre otros. (INIFAP. 2015).

La dependencia federal, hace énfasis en que a nivel nacional sean implementadas estrategias para maximizar el desarrollo productivo del agave, donde se establezca que es necesario impulsar acciones para garantizar la sustentabilidad de esta materia prima. Asimismo, las exportaciones de tequila, tuvieron un crecimiento acumulado de 16.24 por ciento en el mismo periodo.

En cuanto a las nuevas técnicas de producción difieren del enfoque sustentable, ya que al cambiar los sistemas productivos también han cambiado de manera desfavorable. La tecnología de producción intensiva de agave, es una alternativa para obtener materia prima para la industria del tequila, jarabes, inulina, papel, biocombustibles (etanol, hidrógeno, biogás), entre otros, y puede utilizarse en lugares donde la planta de agave se desarrolla naturalmente. (SAGARPA. 2015)

En los últimos 5 años el estado de Guanajuato ha observado un incremento de 40% anual en hectáreas de sembradas de agave de acuerdo a cifras reportadas por la SAGARPA. Debido a lo anterior, los productores en el cultivo han incrementado la superficie, al igual algunas instituciones gubernamentales, privadas y dedicadas a la investigación en este rubro están generando tecnología para el manejo del *Agave tequilana*, principalmente aquellas relacionadas con la protección de enfermedades, plagas y de nutrición. (SAGARPA. 2013).

En cuanto al uso de los fertilizantes químicos y orgánicos, existe una gran variación en las dosis, fuentes y épocas de aplicación con la finalidad de reducir el ciclo del cultivo de 7 u 8 años a 4 o 5 respectivamente. Algunas con buenos resultados en rendimiento y azúcares reductores. (INIFAP 2013). El presente trabajo está basado en la nutrición del *Agave tequilana* mediante la aplicación de productos orgánicos a base de extractos de algas marinas, con el objetivo de reducir el ciclo del cultivo. Se evaluó el efecto en el desarrollo y crecimiento de plantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul, mediante la aplicación del AlgaEnzims^{MR}, TurvoEnzims^{MR} y Alzinc^{MR}. En diferentes dosis una vez por año. La plantación alcanza su madurez fisiológica a los 4 años 6 meses. Lo cual coincide con otras investigaciones como la de (García, 2000).

MATERIALES Y METODOS

El experimento se estableció en agosto del 2012 y la plantación alcanzó su madurez fisiológica y fue jimado en mayo del 2017.

a) Localidad.

El trabajo se desarrolló en una plantación de *Agave tequilana* Weber var. Azul en el predio "La Cabra", terreno rentado por el Sr. Alejandro Villaseñor Segundo y localizado en el Municipio de Abasco Guanajuato. Las plantas utilizadas para la experimentación tenían un año de crecimiento. La distancia entre hileras fue de 3 m y 1.20 m entre planta y planta. El área total fue de 3 ha.

b) Descripción de los Productos empleados.

AlgaEnzims^{MR}. Es un producto biológico a base de macro algas marinas y un complejo de microorganismos que en forma natural viven asociadas, especialmente las microalgas Cianophytas y microorganismos halófilos, que actúan como activadores de las acciones de las enzimas que las algas aportan, mismas que se potencian al propagarse los microorganismos vivos. (Villarreal. 2003). Se ven potenciadas propiedades físico-químicas teniendo un mejor efecto cementante estimulando la formación de microagregados, estabilidad estructural y propicia la formación de espacio poroso. (Reyes R. 1993).

TurboEnzims^{MR}. Funciona como fuente energética nutricional, formulado a partir de extractos de algas marinas y plantas desérticas, ricas en promotores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas) adicionadas con ácidos fúlvicos y elementos nutricionales (nitrógeno, fósforo y potasio). La combinación de las sustancias promotoras de crecimiento y los micro-nutrientes esenciales aporta energía a los mecanismos de desarrollo vegetativo y de resistencia de las plantas, en especial durante la primera etapa de desarrollo.

Alzinc^{MR}. Funciona Es un fertilizante de tipo orgánico de aplicación foliar, que contiene reguladores de crecimiento de origen natural, tales como: auxinas, giberelinas, citocininas, además de elementos nutricionales adicionados como el Zinc y el boro, los cuales también participan como co-factores enzimáticos en una gran cantidad de procesos metabólicos, que a la vez operan conjuntamente entre sí, fortaleciendo los procesos de floración, cuajado y desarrollo de frutos. Funciona como activador de los sistemas enzimáticos, los cuales controlan los procesos metabólicos de las células, aumentando la eficiencia y dinámica de la digestibilidad de la nutrición.

c) Variables evaluadas.

1. Área foliar. Se determinó midiendo el largo y ancho de la penca ubicada en el 5º nivel a partir de la del ápice y se multiplicó por el número de pencas localizadas en forma lineal en la piña y se calculó mediante una fórmula matemática.

2. Largo y ancho de penca. Ubicada a la mitad de la planta se tomó al azar una penca a la cual se midió altura y ancho de la penca.

3. Diámetro y altura de la planta. Se evaluó mediante el uso de flexómetro.

d) Forma de aplicación del producto.

Los productos fueron aplicados una vez por año durante la época de lluvias en los meses de agosto de 3 años, a partir del primer año que tenía la plantación cuando se estableció el experimento. Los productos fueron aplicados directamente en la base de la planta y el suelo de forma manual con la ayuda de un aspersor tipo mochila que contenía las formulaciones descritas en el apartado de los tratamientos.

e) Diseño Experimental y tratamientos.

Tratamiento 1. Mezcla de 1 L/ha de Algaenzims^{MR}, 1 L/ha de Turboenzimst^{MR}, más 0.5 L de Alzinc^{MR}.

Tratamiento 2. 2 L/ha de Algaenzims^{MR}.

Tratamiento 3. Testigo o control.

El Diseño experimento, fue un bloques al azar con 3 tratamientos y 5 repeticiones (cada repetición corresponde a la media de 10 plantas) en total fueron 50 plantas por tratamiento.

f) Agroquímicos.

Los agroquímicos que se aplicaron en varias dosis durante el ciclo del cultivo son los siguientes:

Se realizaron limpiezas de maleza de manera manual.

Se aplicó calcio al inicio de la plantación.

Herbicidas: Malation 1L/ha

Fertilizantes: Triple 16. 45 gr/planta y Foliar 20-30-10.

Herbicidas: Plateo USA polvo 75 gr/hectárea y Finale 1L/ha.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados finales en la tercera aplicación de los productos, los de la 4ª aplicación ya no fue posible tomarlos debido a que el productor Jimó antes de la fecha establecida.

1. Altura de Plantas. El análisis de varianza arrojó una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos con un valor de $F= 22.1259$, $P>F= 0.001$. En el caso de los bloques se tienen las siguientes observaciones para $F=1.2606$, $P>F=0.361$, $SC=0.4155$. El Coeficiente de Variación es de 7.23%. El CM Error=0.007253, GL del Error=8. El uso de AlgaEnzims^{MR}, TurboEnzims^{MR}, y Alzinc^{MR}, ha registrado un incremento en la altura de plantas con respecto a los sujetos de estudio control. La prueba de Medias de DMS con un nivel de significancia de 0.05, señala al *Tratamiento 2* como el más alto, seguido por el *Tratamiento 1*, con respecto al *Tratamiento 3* que es el control. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la prueba de medias.

Tratamiento	Media	DMS = 0.05
2	1.36	A
1	1.17	B
3	1.00	C
DMS=0.1242		

Tabla 1. Prueba de DMS para la altura de plantas bajo diferentes condiciones de estudio.

2. Diámetro de plantas. El análisis de varianza generó una diferencia altamente significativa entre tratamientos con un valor de $F= 20.757$, $P>F= 0.001$. En los bloques es para $F=0.6927$, $P>F=0.619$. El Coeficiente de Variación es de 7.33%. El CM del Error=0.009707, los GL del Error = 8. La prueba de Medias de DMS con un nivel de significancia de 0.05 se presenta en la Tabla 2. El uso de AlgaEnzims^{MR}, TurboEnzims^{MR} y Alzinc^{MR} ha generado un incremento en el diámetro de plantas con respecto a los sujetos de estudio control. La prueba de media señala al *Tratamiento 2* como el más alto, seguido por el *Tratamiento 1*, con respecto al *Tratamiento 3* que es el control. En la Tabla 2 se presentan los resultados de la prueba de medias.

Tratamiento	Media	DMS = 0.05
2	1.53	A
1	1.36	B
3	1.13	C
DMS=0.1437		

Tabla 2. Prueba de DMS para el diámetro de las plantas bajo diferentes condiciones de estudio.

3. Área Foliar. El análisis de varianza arrojó una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos con un valor de $F= 11.2603$, $P>F= 0.005$. En los bloques es para $F=1.1341$, $P>F=0.406$. El Coeficiente de Variación es de 13.2%. El CM Error=337352.0, GL del Error=8. El uso de AlgaEnzims^{MR}, TurboEnzims^{MR} y Alzinc^{MR}, ha generado un incremento en el área foliar con

respecto al sujeto de estudio control. La prueba de Medias de DMS con un nivel de significancia de 0.05, señala que no existe diferencia muy significativa entre el *Tratamiento 2* y *Tratamiento 1*, seguido por el *Tratamiento 3*. En la Tabla 3 se muestran los resultados de la prueba de medias.

Tratamiento	Media	DMS = 0.05
2	4745	A
1	5042	A
3	3406	B
DMS= 0.1437		

Tabla 3. Prueba de DMS para el área foliar de las plantas bajo diferentes condiciones de estudio.

4. Incrementos en Altura, Diámetro y Área Foliar.

En la Tabla 4 se concentran los resultados obtenidos en una población de análisis de 50 plantas evaluadas considerando el tratamiento en cada caso. Se observa que el mayor incremento en estos tres parámetros se observó con el *Tratamiento 2*. Esto genera beneficios para el productor de *Agave tequilana*, el contar con plantas de estas medidas representa un mayor peso de materia vegetal al final del ciclo del cultivo (Imágenes 1-3).

Tratamiento	Altura de Plantas (m)		Diámetro de plantas (m)		Área Foliar (cm ²)	
	Media	Incremento	Media	Incremento	Media	Incremento
2	1.36	36 %	1.53	35.4 %	5042	48 %
1	1.17	17 %	1.36	20.0 %	4745	39 %
3	1.00	Control	1.13	Control	3406	Control

Tabla 4. Valor de las medias y porcentaje de incremento en los parámetros de altura, diámetro y área foliar evaluadas en las plantas de agave.

Las imágenes 1, 2 y 3. Presentan diferentes edades de las plantas.



Plantación de *Agave tequilana* a los dos años (testigo o control).

Plantación de *Agave tequilana* a los dos años con tratamiento de extractos de algas marinas.



Plantación de e *Agave tequilana* a los 3 años con extractos de algas marinas.

CONCLUSIONES

1. Se observó un efecto positivo en el crecimiento del agave al utilizar el *Tratamiento 2* (2 L/ha de Algaenzims^{MR}). Se registró un incremento de 48% en el área foliar, 36% en altura y 35.4% en el diámetro.
2. El efecto en las plantas por el *Tratamiento 1* (Mezcla de 1 L/ha de Algaenzims^{MR}, 1 L/ha de Turboenzimst^{MR} más ½ L de Alzinc^{MR}), promovió un incremento de 39% en el área foliar, 17% en altura de planta y 20% en diámetro respectivamente.
3. El producto orgánico que está registró mejores resultados sobre el crecimiento de la plata de agave es el Algaenzims utilizando 2 L/ha aplicado en su tercer año.
4. Los productos (Mezcla de 1 L/ha de Algaenzims^{MR}, 1 L/ha de Turboenzimst^{MR} más ½ L de Alzinc^{MR}), están acelerando el ciclo del cultivo del *Agave tequilana*. Sin embargo, se puede atribuir una ligera inhibición del efecto de AlgaEnzims^{MR} en presencia de TurboEnzims^{MR} y Alzinc^{MR} como se pudo observar en el ensayo realizado utilizando el *Tratamiento 1* en comparación con el *Tratamiento 2*.
5. La plantación alcanzó su madurez fisiológica a los 4 años 5 meses.

BIBLIOGRAFIA

1. García, F. 2000. Rentabilidad de la fertilización algunos aspectos a considerar. INPOFOS. Boletín 39. Adaptado de Murrell s. and R. Munson.
2. www.inifap.gob.mx
3. www.sagarpa.gob.mx
4. www.palaubioquim.com.mx

PERFIL AGRICOLA SOCIO ECONOMICO DE PRODUCTORES DE AGAVE DEL NORESTE DEL ESTADO DE MÉXICO

Florencia del Carmen Salinas Pérez, Leticia Flores-Alatorre Hernández y Lorena Elizabeth Chávez Gúitrón. lrnchavez@yahoo.com

Universidad Tecnológica de Tecámac

RESUMEN

Actualmente, la región noreste del Estado de México se caracteriza por tener producción de agave pulquero, ya que cuenta con las condiciones climáticas, geográficas, edáficas, y ecológicas, que permiten que se desarrolle esta actividad. Para establecer un diagnóstico de la situación de la producción de maguey pulquero se diseñó una encuesta con la siguiente información: datos generales de los productores, aspectos socioeconómicos, actividad principal que realizan, apoyos agropecuarios percibidos, variedades de maguey cultivadas y prácticas culturales. Se realizó un muestreo de todos los productores de 11 Asociaciones Locales de Producción Rural del noreste del Estado de México, en total se aplicaron 115 encuestas. La estadística utilizada para analizar los datos fue descriptiva. Los resultados de la encuesta son los siguientes: el 76% de los encuestados son del sexo masculino y 24% del sexo femenino. El 76.79% de los productores cuentan con educación básica. En cuanto al estado civil el 81.62% conviven en un núcleo familiar (casados o en unión libre). El tipo de ocupación que reporta 76% es la agricultura. Con respecto a los apoyos agropecuarios, el 84.34% no dispone de ese recurso. Las principales variedades de agave pulquero que cultivan son: *Agave salmiana* y *Agave mapisaga*. Los productos que se obtienen y comercializan son: pulque, aguamiel, penca, plantas de maguey y gusanos de maguey. Con relación a las actividades culturales, el 94% realiza una poda cada 12 meses y el 95% deshierba, actividad que el 90% realiza de forma manual y el 5% utiliza herbicidas y el 88.5% fertilizan sus cultivos aplicando estiércoles o composta. Aunque este grupo de productores se encuentran organizados en Asociaciones Locales de Producción Rural se requiere innovación en el desarrollo de nuevos productos, que este cultivo se considere dentro del Sistema Producto, contar con apoyos económicos para el cultivo y la industrialización, así como asesoría técnica.

INTRODUCCIÓN

La familia Agavaceae es endémica de América e incluye nueve géneros y cerca de 340 especies, México es el centro de mayor riqueza y diversidad, pues se distribuyen 261 especies (76% del total), de las cuales 187 son endémicas. Los agaves crecen en las planicies, montañas, acantilados, dunas costeras o en picos montañosos, preferentemente entre los 1,000-2,000 msnm.

Son plantas hermafroditas y monocotiledóneas, poseen hojas suculentas dispuestas en espiral alrededor de un tallo corto y grueso (piña), las hojas pueden ser rectas o dobladas, carnosas, de bordes espinosos, el color varía desde el verde claro hasta el verde oscuro casi púrpura, pasando por varios tonos de azul, incluso pueden ser de color amarillo, la espina terminal es dura; su escapo floral (comúnmente llamado quiole) llega a medir 12 metros.

De estas plantas se obtienen diversos productos tales como fibras, alimento, material de construcción, sustitutos de jabón, etc., pero únicamente del género *Agave* se obtienen bebidas fermentadas o destiladas, tal es el caso de la especie *Agave salmiana* de donde se obtiene el pulque, además es tradicional la extracción de la cutícula de la hojas, denominada "mixiote" la cual se emplea para contener un platillo tradicional mexicano que lleva el mismo nombre; a su vez dichas pencas pueden ser utilizadas como forraje para alimentación animal.

El maguey, *Agave salmiana*, la planta más característica del Altiplano de México, y su producto principal, el pulque, forma parte de la tradición cultural del pueblo mexicano, se cultiva desde tiempos prehispánicos. La producción anual promedio de pulque es de 250 mil litros (Olvera, 2013).

De acuerdo con cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la producción de agave pulquero en 2016 ascendió a 249 millones de litros, destacando el estado de Hidalgo con una producción que representa el 78.1% del total nacional.

Debido a su alto nivel de explotación de la cutícula de sus pencas para elaborar mixiotes, corte de pencas para la barbacoa; construcción de techos, obtención de gusanos chinicuilles, así como para forrajes, fibras para la fabricación de reatas, celulosa, papel, saponinas, bebidas y la explotación de

miel para usos medicinales, ello ha provocado la disminución del inventario de plantas de maguey, por todo lo anterior actualmente es una de las especies que están en peligro de extinción. Este estudio se definió para conocer el perfil agrícola socio económico de productores de maguey pulquero del noreste del México.

TEORÍA

Los Agaves son plantas cuyas características fisiológicas y morfológicas les permiten una capacidad de adaptación a los ambientes más hostiles. Este género es originario de Mesoamérica y se distribuye desde los 34 ° Latitud Norte hasta los 60 ° Latitud Sur (García-Herrera et al., 2010).

México es considerado uno de los países con mayor diversidad de especies, el maguey requiere de un tiempo de maduración promedio de 10 años para poder utilizarse en la obtención de agua miel y elaboración de pulque, mezcal, tequila y otras variedades de aguardiente, por lo que se trata de un recurso que necesita tiempo para recuperarse.

El maguey pulquero, es el que mayor presencia tiene en el altiplano central mexicano, de esta planta se pueden aprovechar todas sus partes, incluso sus plagas. Los productos de mayor valor comercial, que se pueden obtener son: aguamiel, pulque, gusano rojo, gusano blanco y las pencas que se utilizan para la elaboración de barbacoa y mixiotes (Narváez-Suarez, et al. 2016).

Monterrubio (2007), hace la observación “que a partir de 1880 durante el Porfiriato” con la introducción del ferrocarril al país, la producción artesanal de pulque obtuvo ventajas por una mayor demanda del producto ocasionada por un canal de comercialización directo hacia las grandes ciudades.

Durante la segunda mitad del siglo XX continuó el auge de expendios y locales que comercializaban el pulque en la región centro del país, esta situación demandó una producción extensiva del agave en el campo. Olvera (2013) menciona que en 1984 se alcanzó la mayor producción de aguamiel (9'885,739 lts), pero a partir del terremoto de 1985 la producción tuvo una reducción del 99.57%, sólo se produjeron 43,146 lts.

Actualmente, la industria de este tipo de productos está padeciendo las consecuencias de la sobreexplotación y la deforestación de zonas dedicadas al cultivo del agave, por lo que la oferta es baja. Además, la práctica del saqueo y robo con violencia por parte de gavillas organizadas en Nanacamilpa y Calpulalpan en Tlaxcala, así como en la región Teotihuacán, en el Estado de México, ha profundizado esta problemática. Aunque se cuenta con una Ley de Protección al Maguey en el Estado de México, el delito de robo está tipificado como no grave, además de la no acción por parte de las autoridades,, ello ha ocasionado llevar al agave pulquero casi al punto de la extinción. Otra de las situaciones que afectó a las comunidades productoras de pulque fue la desaparición del tren de pasajeros, ya que este medio de comunicación permitía la transportación del pulque de forma directa hacia la ciudad de México (Monterrubio, 2007). Lo anterior se ve reflejado en las siguientes estadísticas: de 1990 a la fecha, la producción de maguey ha disminuido de 20 millones de plantas a un millón 600 mil (Olvera, 2013).

PARTE EXPERIMENTAL

Se aplicó una encuesta aleatoria a 115 productores agrícolas de diferentes localidades del Estado de México (Otumba, Temascalapa, Axapusco, Tecámac, Teotihuacán y San Martín de las Pirámides). Las encuestas fueron aplicadas entre los meses de febrero y mayo del 2017. La cédula fue diseñada considerando datos generales del productor y socioeconómicos, actividad principal que realizan, apoyos económicos con los que cuentan, producción obtenida para la actividad: maguey, nopal tuna, nopal verdura; así como productos agroindustriales. También se realizaron foros de discusión con los productores. Los datos obtenidos se analizaron con estadística descriptiva (Statística para Windows).

RESULTADOS

Aspectos generales de los productores

El 76% de los productores encuestados son del sexo masculino y el 24% de los productores son mujeres. Con respecto al estado civil de los productores encuestados el 55.38% están casados, el 9% son solteros, el 25.62 % viven en unión libre, el 4% está divorciado y el 6% son viudos.

Nivel de estudios

En cuanto al nivel de estudios de los productores encuestados el 44 % cuentan con primaria, el 32.79%, con estudios de secundaria, el 5% con estudios de bachillerato, el 7% con estudios técnicos y el 1% posgrado.

Actividad principal

Con respecto a la actividad principal el 63% de los encuestados son productores agrícolas, el 13% se dedican a comercializar productos derivados del maguey, 10% se dedican al hogar, 13% son empleados y/o comerciantes y el 1% está jubilado.

Variedades de Agave

En esta región las variedades de agave que se cultivan son: Manso, *Agave salmiana* var. *salmiana*, Ayoteco, *Agave salmiana* var. *Ayoteco*, *Agave mapisaga*, 'Verde', 'Carrizo', 'Negro' y 'Xilometl'.

Aspectos de comercialización

Los productos que comercializan los productores de maguey son: Aguamiel, pulque, pencas, productos elaborados a partir del aguamiel, gusanos de maguey y plantas de maguey. En el caso de las pencas el 88% las venden directamente a los consumidores y el 22% las comercializan a intermediarios, con respecto a los productos obtenidos a partir del maguey, estos se comercializan de forma local. Las operaciones de compra venta se realizan con pagos en efectivo el aguamiel a un precio entre \$10.00 por litro, el pulque \$20.00 por litro y la penca de maguey de \$3.00 a \$5.00 por unidad y los gusanos de maguey entre \$400/l.

Manejo de los cultivos

Poda y Deshierbe

La poda es una actividad cultural necesaria para lograr el desarrollo agrícola que requieren estos cultivos, considerando las limitaciones del suelo, agua y nutrientes. El 94% realizan esta actividad, 79% lo realizan de forma anual, 19% cada 6 meses y 2% cuando se requiere.

Dentro de las actividades de manejo, el deshierbe es una actividad importante, ya que favorece el desarrollo de la planta y las labores de cosecha se facilitan. Esta actividad se realiza en el periodo de lluvias. El 96% de los productores realizan esta actividad. De los productores que deshierban el 90% de los productores deshierban de forma manual, utilizando mano de obra familiar, el 5% realizan el deshierbe utilizando químicos.

Fertilización y Control de Enfermedades

De los productores de maguey encuestados el 88.5% fertilizan realizando esta actividad con estiércol fresco. Con respecto a la periodicidad de la fertilización el 87% de los productores que fertilizan realizan esta práctica anualmente y el 13% restante de forma semestral.

Con respecto al control de plagas el 61% de los productores realizan esta actividad, de estos el 44% lo hacen de forma anual, el 30% semestralmente, el 12% cuatrimestralmente y el 14% mensualmente.

Apoyos agropecuarios

Con respecto a los apoyos institucionales y agropecuarios, el 84% de los productores encuestados reciben este tipo de apoyo, el 68% recibe apoyos de SEDAGRO, el 15% recibe beneficios tanto de programas de SEDAGRO como de SAGARPA y el 1% recibe apoyos de la Federación y de programas del Estado de México.

Asesoría Técnica

El 75% de los productores encuestados recibe asesoría técnica. Esta es impartida en la mayoría de los casos por instancias gubernamentales como la Secretaría de Desarrollo Agropecuario (SEDAGRO); así como también talleres impartidos por investigadores de la Universidad Autónoma de Chapingo y de la Universidad Tecnológica de Tecámac.

Problemática identificada por los productores agrícolas encuestados

Las problemáticas más relevantes son: largo tiempo de desarrollo de la planta que en ocasiones implica hasta doce años para que la planta produzca, por lo que se ha sustituido la producción de maguey por cultivos alternativos (maíz, cebada y haba); las campañas de desprestigio del pulque han disminuido su consumo, ya que existe una subvaloración social por esta bebida; la práctica del saqueo con violencia por parte de grupos organizados que sustraen pencas para la elaboración de barbacoa, mixiotes, consumo de la flor y obtención de gusanos de maguey (Jacinto y García 2000), ha desalentado a los productores para la explotación de este recurso. Para la obtención de la hoja del mixiote se remueve la cutícula de la hoja que produce un efecto negativo en el desarrollo de la hoja de los agaves (Jacinto y García 2000). En el Estado de México se requiere una ley de protección

al Maguey que contemple sanciones a los individuos que roben y/o dañen a la planta. Lo anterior ha ocasionado que el agave pulquero esté al borde de su extinción en esta región. En Oaxaca están en peligro de extinción al menos ocho variedades de maguey silvestre, planta con la que se produce el mezcal, bebida que identifica y da renombre a la entidad. “De acuerdo con los productores oaxaqueños, el riesgo de la desaparición de los magueyes se debe a la sobreexplotación y la falta de apoyo gubernamental en programas de manejo, control y conservación de la planta, lo que ha provocado que pocos productores se dediquen a la explotación de esta planta” (“Varias especies de maguey en riesgo de desaparecer, 2016”). Narváez-Suárez et al., 2016, realizaron un estudio para considerar al maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) una opción para el desarrollo rural, sus resultados demostraron que la explotación del maguey pulquero es rentable y factible para el desarrollo del ejido por sus beneficios económicos y sociales. En la región evaluada en este estudio, aunque existe interés por reforestar, la falta de semilla, la obtención de planta por medio de hijuelos, la escasez de agua y erosión de los suelos ha limitado el desarrollo de esta actividad. Otra de las problemáticas es la falta de nuevas tecnologías para la industrialización del pulque. La reforestación con maguey es importante para el ecosistema, forma parte de la cadena biológica, lo que repercutiría en la recuperación de los suelos.

Para resolver esta problemática en la región y evitar la extinción de la planta de maguey se proponen las siguientes estrategias:

1. Inclusión de un apartado de sanciones por daño a la planta, en la Ley para la protección al Maguey del Estado de México
2. Establecimiento de bancos de germoplasma de Agave (manso, púa larga, chalqueño y ayoteco, variedades de grandes rendimientos para la extracción de jarabe de fructosa y aguamiel).
3. Establecimiento de laboratorios de cultivo “in vitro” para la propagación y conservación de diferentes variedades de esta planta.
4. Capacitación a los productores para la comercialización de sus productos en el mercado nacional.
5. Diversificación de productos a partir de la planta de Agave, como inulina, jarabe de fructosa, mezcal, y aprovechamiento del ixtle.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de las encuestas aplicadas en diferentes localidades del Estado de México, en su mayoría los hombres se dedican a esta actividad, Actualmente existe una pérdida del maguey como cultivo intensivo, pocos productores se dedican a este cultivo, se ha sustituido el maguey por otros cultivos alternativos, como la cebada, se requiere más capacitación para los productores, darle valor agregado a sus productos, buscar nichos de mercado regionales. Además es muy importante que la autoridad establezca sanciones por daños a la planta.

BIBLIOGRAFÍA

1. García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. J., & Talavera-Magana, D. (2010). El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Special Ed*, 5, 109-129.
2. José Jacinto, R., & García Moya, E. (2000). Remoción cuticular (" Mixiote") y desarrollo foliar en los agaves pulqueros (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (66).
3. Narváez Suárez, A. U., Martínez Saldaña, T., & Jiménez Velázquez, M. A. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, (56).
4. Olvera j. 2013. Despiertan los gigantes, el pulque y el maguey pulquero. Recuperado el 30 de diciembre del 2013. De: <http://agroenvi.com.mx/despertan-los-gigantes-el-pulque-y-el-maguey-pulquero>.
5. Monterrubio, a. L. (2007). Las haciendas pulqueras de México (vol. 35). México: UNAM.
6. Narváez-Suárez, A. U., Jiménez-Velázquez, M. A., Martínez-Saldaña, T., & Cruz-Galindo, B. (2016). Maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck): Opción para el Desarrollo Rural. *Agroproductividad*, 9(10).

7. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2012. Plan Recto del Sistema Producto Nopal y Tuna del Estado de México. 29 p.
8. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP 20123. Cierre de la producción agrícola. Nopalitos. <http://www.siap.gob.mx> (consultado octubre 2016). Varias especies de maguey en riesgo de desaparecer. En: Foro ambiental Recuperado

APLICACIONES SUSTENTABLES PARA INTRODUCCIÓN DE PRODUCTOS GENERO MALUS ALTA DENSIDAD EN EL MUNICIPIO DE TEPETITLA TLAXCALA (PRIMERA ETAPA)

Pedro Ramírez Legorreta¹, Ada María Ríos Cortés¹, Liliana Barraza Ronquillo², Minerva Rosas Morales¹ y Pedro Ramírez Calva¹

¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, ²Jardín y Decoración S.A.

RESUMEN

Con el presente proyecto se realiza la transferencia del paquete biotecnológico para la producción de manzana en el estado de Tlaxcala que dada sus condiciones climáticas y edáficas lo hacen ideal para el cultivo en altas densidades. Considerando que este cultivo de manzana recientemente introducida, tendrá altos rendimientos y calidad. Para este objetivo se aplicaron los siguientes procedimientos científico técnicos: geolocalización y acondicionamiento de terrenos, análisis de suelos, análisis de calidad del agua, metodología de siembra, fertilización, control de malezas, selección de portainjertos y variedades adaptables, riego, nutrición y manejo fitosanitario.

Se realizaron plantaciones (variedades M7, M9, M26 y B9) en más de treinta hectáreas de terreno, para cumplir este objetivo se planteó el trabajo de seguimiento y evaluación, que consistió en la aplicación del método de multiplicación vegetativa a través de estacas de tallo en esquejes de un año que brotan alrededor de los árboles portainjertos y retoños de las plantas patrón.

En la primera etapa, los plantíos se encuentran en franco desarrollo y se espera en 18 meses aparezca floración, para finales de 2019 podremos efectuar los primeros cortes del fruto variedad inicialmente Gala, manzana que solo se consume de otros productores, de igual manera se está experimentando comparativos en otros cultivos alternos con similar beneficio.

El Municipio de Tepetitla, investigadores y empresarios ven con buenos ojos esta innovadora potencialidad de producción de manzana, es por esta razón que se está apoyando este trabajo de investigación con fines de buscar detonar una nueva cultura de propagación sustentable a través del material genético mejorado que introdujeron productores de Chihuahua aplicado en terrenos del municipio elegido, de esta manera ayudar a resolver problemas de monocultivo, usos agrícola de agua contaminada y rechazo generalizado de las hortalizas que también se producen en esta zona. Es factible detonar un proceso de desarrollo frutícola a partir de un modelo de valorización que consta de los elementos siguientes: enfoque territorial, enfoque ascendente (desde abajo) y conformación de un equipo de acción local, estrategia de innovación basada en medidas y acciones dirigidas a promover procesos mejorados de producción, transformación, comercialización, participación institucional y vínculos con otros sectores, organización en red de los productores y del comercio, y gestión de la estrategia y financiamiento de proyectos frutícolas.

INTRODUCCIÓN

En México la generación de productos biotecnológicos está en gran crecimiento debido a la demanda de mercados extranjeros, y un 70% de los frutos generados son para exportación, es por ello que los productos que se quedan en el país no se encuentran fuertemente atendidos en cuanto a desarrollo e investigación en el ramo biotecnológico debido a que es costoso el introducir estas tecnologías a la producción de "frutas finas" las cuales cumplen con estándares e investigación que permea en su calidad y aceptación. (Estudio, SAGARPA 2017).

Identificando la necesidad de los productores de manzana en Chihuahua la empresa Huertos Vanguardistas se centrará en inicio a la generación de porta injertos y generación de variedades de manzana que permitan a los productores desarrollar huertos productivos en promedio tres años. Es por ello que analizando un estudio generado por SAGARPA menciona "La manzana representa uno de los conceptos de mayor gasto en las familias mexicanas. México es el decimotercer productor de manzana en el mundo. Pese a los importantes incrementos en su productividad nacional promedio en el periodo 2003-2016, equivalentes a 44.65%, la producción de 716,913 toneladas en 2016, cubrió únicamente 77.26% del consumo nacional, por lo que este producto se importa en fresco, principalmente de Estados Unidos (97.82% del total de las importaciones)". (Estudio, SAGARPA 2017).

Aun cuando se han generado logros importantes en la producción frutícola para condiciones particulares, se han detectado ineficiencias en los procesos productivos (como baja productividad

derivada de un manejo técnico inadecuado de los árboles), de transformación (procesos de muy pequeña escala y de calidad no aceptable), y comercialización (bajos precios asociados al mercado local de productos), lo que justifica la formulación y aplicación de una estrategia de valorización de la producción local tendiente a lograr un desarrollo frutícola más amplio. Esta estrategia, con base en el enfoque de cadenas productivas, está encaminada a incrementar el valor agregado de los productos frutícolas. En el contexto del enfoque de desarrollo local, el incremento de valor se busca lograr mediante la aplicación de algunas medidas que propone el modelo de desarrollo empleado en Europa LEADER: enfoque territorial y ascendente, gestión local, enfoque integrado e innovador, organización y financiamiento (Cazorla et al., 2005).

Los productores de la región Tepetitla, Tlaxcala disponen de un sistema diversificado de producción y comercialización agrícola tradicional, que se caracteriza por la incorporación de frutales criollos de baja calidad y que se manejan deficientemente, donde se intercalan cultivos anuales y forrajeros entre las hileras de los árboles con el propósito de asegurar la alimentación de la población rural. Por lo que este proyecto cumple con una función social y permite que el productor se apropie de algunos recursos. Sin embargo, la importancia del componente frutícola con que se aborda este trabajo, se concibe a partir de que puede constituirse en el motor económico de dicho sistema, mediante la obtención de frutas mejoradas y de buena calidad que podrían ubicarse en condiciones y mercados más favorables.

Por lo que en el caso del sector frutícola se plantean las siguientes preguntas: ¿cuáles son los principales factores que están limitando los procesos de producción, transformación y comercialización?, ¿qué tipo de alternativas tecnológicas y de mercado se dispone?, ¿cuáles organizaciones locales están presentes y cuál es el papel que están jugando las instituciones de fomento a la producción y de desarrollo agrícola y rural?, y ¿cómo pueden contribuir el enfoque de cadenas de valor y de los productos locales?.

El objetivo general de este trabajo consiste en realizar una caracterización y un análisis de valorización en los principales componentes de la cadena productiva frutícola en el territorio de Tepetitla y alrededores de Tlaxcala, incluso poblaciones vecinas de Puebla México, y proponer una estrategia de valorización de la producción local encaminada al inicio con el producto manzana, sin dejar de probar con otros frutales. Como hipótesis general se plantea que es factible el mejoramiento productivo y económico del sector frutícola mediante el uso de tecnologías y mercados alternativos, y que la aplicación de una estrategia de innovación referente a la valorización de la producción local de este sector podría contribuir en buena medida a promover su desarrollo en un sentido amplio.

La valorización de la producción se refiere a revalorar, agregar valor y tomar en cuenta productos locales o recursos que tienen un alto potencial de desarrollo dentro de un territorio, incluyendo los conocimientos técnicos y las culturas locales, en donde la calidad, el mercado y las estrategias comerciales juegan un papel importante (Comisión Europea, 2005). La valorización en este trabajo guarda una relación estrecha con las distintas formas de innovación, entendida ésta como la introducción de algo novedoso y auténtico en cualquier proceso (Knudson et al., 2004).

También se refiere al incremento de la productividad por medio del uso de tecnologías alternas, teniendo en cuenta la diversidad de especies en los patrones de cultivo (Dixon et al., 2001; Gordon et al., 2002). Así como al valor agregado por medio de la transformación de productos con mayor calidad y la creación de colectivos con pequeñas empresas (AEIDL, 1995), donde se señala que este supera al valor agregado que proviene únicamente de la comercialización de los productos frescos.

En esta investigación primero se realiza una caracterización de los terrenos disponibles y del sector frutícola, y enseguida se propone la aplicación de una estrategia de valorización de la producción local en Tepetitla Tlaxcala, la cual se formuló previamente de manera conceptual, tendiente al desarrollo sustentable de la región.



Imagen 1: Grupo de inversionistas e investigadores

TEORÍA

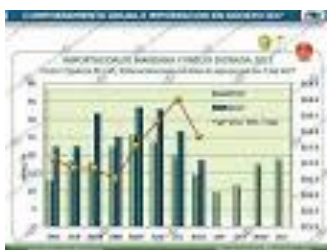
La aplicación de estudios en las cadenas de valor agroalimentario actualmente es obligatorio, importante es producir alimentos que tienen mayor demanda, lo es más garantizar un mercado de consumo del producto antes de cosecharlo. En el presente proyecto se plantea la consolidación del paquete tecnológico para la producción de manzana en el estado de Tlaxcala que dada sus condiciones climáticas y edáficas lo hacen ideal para el cultivo en altas densidades. Se inició la introducción de nuevas variedades de manzana en el Municipio de Tepetitla, Tlaxcala con el respaldo del Instituto Politécnico Nacional a través del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, este acuerdo garantiza el buen desarrollo de los huertos desde la preparación de terreno, análisis de suelos, análisis de calidad del agua, método de siembra, fertilización, control de malezas, selección de portainjertos y variedades adaptables, riego, nutrición, manejo fitosanitario, entre otros. Es inminente se tendrá una producción inicial en toneladas en un margen de dos años, que deberán ser introducidas a mercados de consumo directo al consumidor e indirecto vía Centros Comerciales, previo plan de marketing estructurado en el presente proyecto de investigación el cual contempla analizar los actuales mercados de consumo, su comportamiento estacional, la presencia del consumidor, la segmentación de mercado centro del país. Pretendemos generar y dar a conocer indicadores clave para los productores respecto al producto manzana, valorar competencia, precios, márgenes de utilidad, centros de distribución y comunicación; información que tiene la finalidad de poder facilitar la toma de decisiones que impactarán en la reinversión para mejora en agricultura protegida y sustentable, sobre todo en hacer contrataciones oportunas de personal y seguir así generando empleos de todas las especialidades.

A nivel mundial, las variedades más cultivadas bajo la normativa de producción integrada y convencional son las de los grupos Gala, Red Delicious, Golden y Fuji; todas ellas susceptibles, en mayor o menor grado, a plagas y enfermedades (Iglesias et al., 2009). Su uso en producción ecológica aumenta el riesgo de pérdidas económicas ya que las técnicas de control fitosanitario disponibles bajo esta normativa, no siempre alcanzan los niveles de eficacia que las utilizadas en agricultura convencional o integrada. Por este motivo, en producción ecológica, el uso de variedades resistentes es la primera decisión importante que se debe tomar, es por esto que gracias a la experiencia de líderes en el ramo de la empresa Huertos Vanguardistas, la hora de iniciar una nueva plantación es la elección de la variedad a plantar ya que la rentabilidad depende, en gran medida, de su adaptación al medio y de su dependencia de insumos. Dicha elección condiciona diferentes aspectos agronómicos tales como la poda y la formación de los árboles, el aclareo, los problemas fitosanitarios y la época de cosecha.

El avance experimentado con empresarios del ramo en Chihuahua, en las tres últimas décadas ha sido muy significativo y en la actualidad se dispone de algunas variedades con un buen comportamiento agronómico y de una calidad organoléptica al nivel de las variedades tradicionales. Según los productores, la variedad Gala comprende alrededor del cinco por ciento del área plantada total en México. Las nuevas variedades Gala y Golden Suprema de Chihuahua ingresan al mercado a mediados de agosto, fecha en que comienza la cosecha de manzana Red Delicious. Las manzanas Golden Delicious son cosechas de septiembre. Las manzanas Rome Beauty generalmente se cosechan a principios de octubre y toda la cosecha en el estado de Chihuahua se completa a fines de octubre. Los productores en Chihuahua generalmente usan tecnología de producción más avanzada que en otros estados, lo que resulta en manzanas de mayor calidad. Industria fuentes informan que los productores a gran escala y tecnológicamente sofisticados en Chihuahua están

renovando viejos huertos y plantaciones con mayor densidad de árboles. También hay más inversión en protección de granizo y en instalaciones de almacenamiento en frío con tecnología de atmósfera controlada y cuentan con infraestructura de riego, a través de rociadores, micro aspersores y riego por goteo.

El consumo doméstico nuevo 2017 se pronostica a una baja de 823,000 TM, debido a una menor demanda esperada. Esto, sin embargo, dependerá de los precios internacionales y de la depreciación del peso frente al dólar que aumentará los precios de la fruta importada. De hecho, los mercados mayoristas esperan fruta más cara tanto del mercado nacional como internacional. Los minoristas también están observando que los consumidores están comprando menos cantidad de fruta debido a los precios. Las estimaciones del consumo de manzanas en 2018, se revisaron al alza con respecto a las estimaciones anteriores debido a la fuerte demanda a buenos precios. Cuatro variedades continúan dominando el mercado mexicano y representan el 98 por ciento del volumen importado hasta la fecha: 39 por ciento Red Delicious, 30 por ciento Gala, 22 por ciento Golden Delicious, 7 por ciento Granny Smith y 2 por ciento Fuji y otras variedades. Los consumidores mexicanos prefieren las variedades Red y Golden Delicious y han desarrollado una fuerte preferencia por la variedad Gala. Según la industria, el consumo de manzanas está impulsado por el sector minorista, que representa el 54 por ciento del consumo interno. No hay información oficial sobre el consumo de manzana per cápita. Las variedades de Apple como Rome Beauty, Jonagold y Pink Lady se importan en cantidades mucho más pequeñas, según las preferencias del consumidor. Mientras que a los consumidores mexicanos les gusta el tamaño y el color de las manzanas estadounidenses, las manzanas mexicanas se consideran más dulces. La industria de manzanas de los EE. UU. seguirá enfrentando una competencia limitada en México desde luego otros países como Chile. Las manzanas de otros países como Nueva Zelanda, China y Canadá se pueden encontrar en el mercado en volúmenes muy pequeños.



Gráfica 1. Producción de manzana



Imagen 2. Huertos en desarrollo

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó una caracterización de la zona de Tepetitla a partir de información secundaria, tomando en cuenta principalmente una serie de indicadores socioeconómicos relacionados con la población, extensión territorial, grado de disponibilidad de terrenos agrícolas, grado de dependencia entre los habitantes, disponibilidad de agua, la dependencia económica que se da en relación con los sectores productivos, entre otros. Esto permitió la selección de cuatro zonas del municipio y la geolocalización como apoyo a la propuesta de acciones relativas de inicio con patrones de manzana. también se realizó un análisis del papel que están desempeñando los productores, sujetos sociales y las instituciones de gobierno municipal, estatal y centros de investigación que apoyan este sector; a saber, Chapingo, Instituto Politécnico Nacional (IPN) y en particular el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CIBA).



Imagen 3. Fase experimental en cultivos de reproducción y evaluación celular

La conformación de la estrategia de valorización frutícola fue la siguiente:

Enfoque territorial. Se refiere a la definición de un ámbito de actuación, con base en indicadores socioeconómicos y en criterios de homogeneidad física, económica y social. Actividad determinante realizada por los empresarios de Chihuahua.

Enfoque ascendente. Como parte del método participativo en la toma de decisiones, y la propuesta de constitución de una posible nueva empresa, como representantes legítimos (no por mandato) de los actores y beneficiarios interesados. Actualmente se coordina por medio de los inversionistas.

Un plan de acción innovador orientado a procesos productivos y de distribución alternos (mejorados) que toma en cuenta la calidad, localidad, originalidad, mercado y tipicidad de los productos, vinculada a un ámbito de especial interés para consumidores del centro del país; en este caso del sector frutícola y pudiera extenderse al sector ornamental. el plan de acción se fundamenta en la elaboración y operación de una extensión al proyecto de vinculación, investigación e innovación con el CIBA-IPN Tlaxcala que se plantea fortalecer para la segunda etapa de mismo.

Con el respaldo de un plan de negocio y de marketing, incidir en la comercialización de los productos dentro y fuera del territorio, mediante diversas formas de asociación y uso de información disponible en internet, así como la integración en red con otros programas y territorios similares, o sea, la organización de los actores sociales e institucionales. Desde luego también implica participar activamente en foros, expos, encuentros y congresos del ramo, nacionales e internacionales.

Operación local de un programa piloto, que incluye financiamiento y apoyo técnico de empresarios expertos de chihuahua, y científico del CIBA-IPN además fortalecer las relaciones con las instituciones del estado de Tlaxcala que apoyen el programa y que permitan inyectar recursos de financiamiento institucional SAGARPA, CONACYT, y del Gobierno de Tlaxcala.

Otro esquema, el valor agregado de los productos que debe darse como resultado de la aplicación de la estrategia de valorización (mediante acciones productivas), que puede estimarse mediante la diferencia entre el valor generado con proyecto y el valor generado sin proyecto, este trabajo se programa para la segunda etapa porque todavía no se cubre la de aplicación de la estrategia en el ámbito producción de variedades de manzana, ciruela, durazno y nuez.

RESULTADOS

Los criterios basados en homogeneidad física, económica y social (Alier et al., 2002) indican que en Tepetitla y alrededores el clima es templado con lluvias en verano donde las bajas temperaturas (heladas) y el granizo constituyen un cierto riesgo para las variedades de manzana. Los suelos ricos en materia orgánica de textura ligera (arenosos), en los cuales es posible la conservación de humedad residual durante el invierno mediante prácticas de roturación, lo que favorece la producción de frutales en condiciones de temporal. La superficie con riego derivado tanto de aguas rodadas como de pozos profundos, lo que se asocia con el cultivo de especies comerciales como maíz, alfalfa y hortalizas.

El suelo está compuesto por minerales, materia orgánica, diminutos organismos vegetales, animales y microorganismos, aire y agua. El tamaño de las partículas minerales que forman el suelo determina sus propiedades físicas textura, estructura, porosidad y el color, todos estos parámetros implicados en la fertilidad del suelo. Según su textura podemos distinguir tres tipos de suelos: **arena**, **arcilla** y **limo**. La arena es la que existe en los diversos ríos. Los suelos **arenosos**, como son más

suelos son fáciles de trabajar pero tienen pocas reservas de nutrientes aprovechables por las plantas.

Los suelos **limosos** tienen gránulos de tamaño intermedio, son fértiles y fáciles de trabajar. Forman terrones fáciles de desagregar cuando están secos.

La **arcilla** son partículas muy finas y forman barro cuando están saturadas de agua. Los suelos arcillosos son pesados, no drenan ni se desecan fácilmente y contienen buenas reservas de nutrientes. Son fértiles, pero difíciles de trabajar cuando están muy secos.

Para cultivos de manzano se debe tener ciertas características del suelo:

- De textura franco-arenosa a arenosa-franca. Ciertos portainjertos también se desarrollarían bien en suelos de textura franca
- Bien drenado
- Sin impedimentos físicos para la exploración radical
- Sin presencia de piedras, gravas o cantos rodados
- En cuanto a su historia, que no provenga de cultivo reciente de manzano pero sí de pasturas de varios años
- Que sea lo más homogéneo posible, para facilitar el manejo del riego en caso de que sea por método gravitacional y lograr uniformidad en el cultivo

Las propiedades químicas del suelo dependen de la cantidad de los distintos minerales y otras sustancias que componen el suelo. El contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio debe ser abundante y equilibrado. El suelo puede ser ácido, alcalino o neutro.

- Un **suelo ácido** es aquel que presenta ciertos elementos químicos de carácter ácido en mayor proporción que otros.
- Un **suelo neutro** es cuando presenta porcentajes equilibrados y disponibilidad de los elementos químicos primarios y secundarios. El boro, aluminio, zinc, hierro y litio también están presentes en menor proporción.
- Un **suelo salino** o **alcalino** es aquel que presenta azufre, calcio, magnesio, manganeso y molibdeno en mayor proporción que otros compuestos. Estos elementos, cuando se encuentran en concentraciones mayores, hacen que un suelo sea salino o alcalino.

Los manzanos crecen mejor con un pH del suelo entre 5,0 y 7,0.

Dentro de los requerimientos nutrimentales en los suelos de manzano se encuentran:

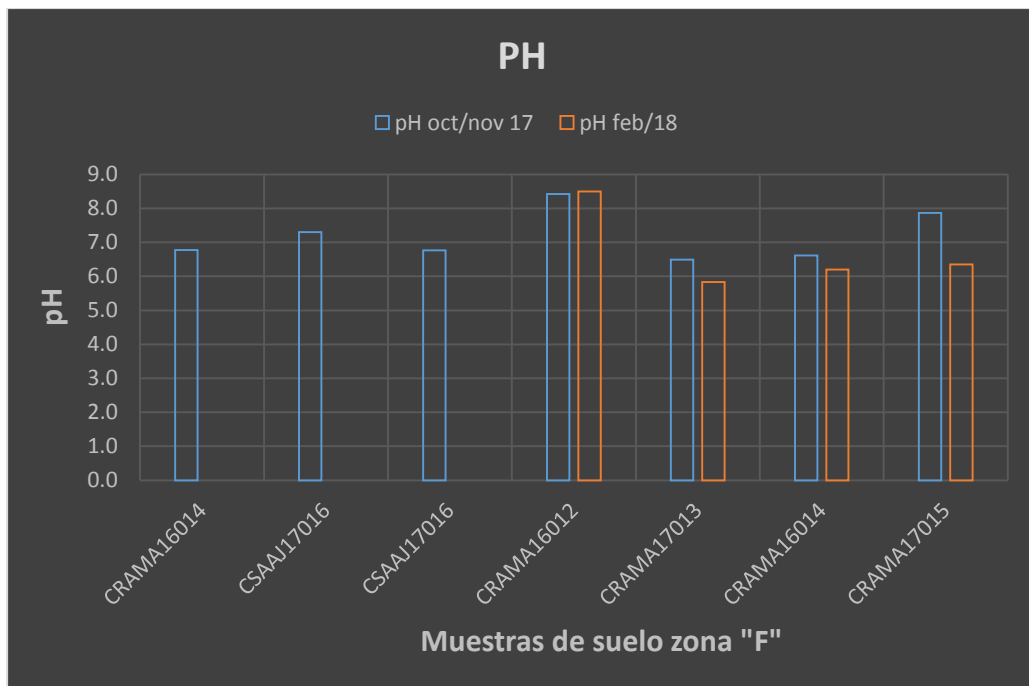
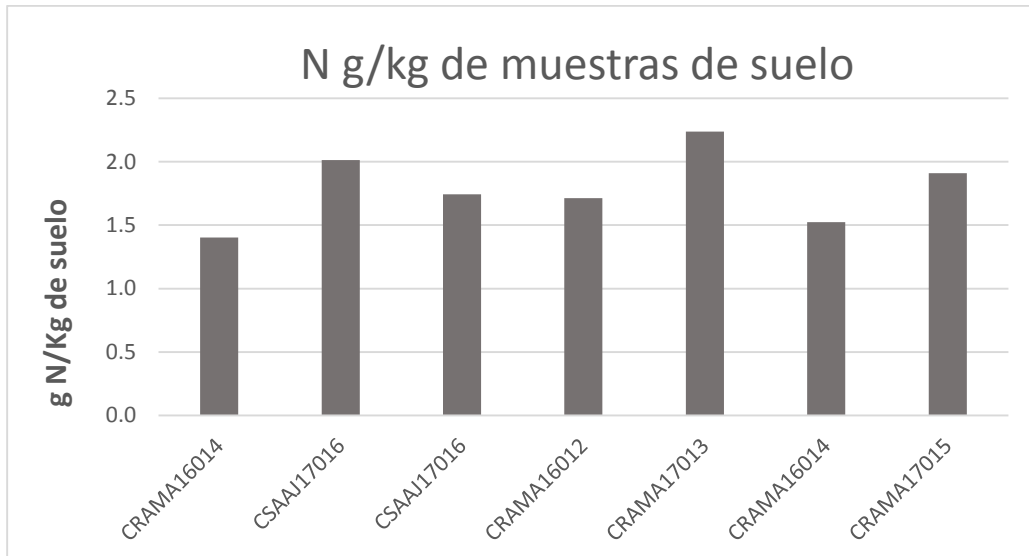
Nutriente	Muy Bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy Alto
N	1 - 10	11 - 20	21 - 35	36 - 60	> 60
P	< 4,0	4,1 - 10,0	10,1 - 16,0	16,1 - 25,0	> 25
K	< 50	50,1 - 100	100,1 - 180	180,1 - 250	> 250
S	< 6,0	6,1 - 12,0	12,1 - 20,0	20,1 - 30,0	> 30
Cu	< 0,1	0,1 - 0,3	0,3 - 0,5	> 0,5	-
Zn	< 0,25	0,25 - 0,50	0,50 - 1,0	> 1,0	-
Bo	< 0,2	0,2 - 0,5	0,5 - 1,0	> 1,0	-
Mo	< 0,05	0,05 - 0,10	0,11 - 0,20	> 0,20	-
Fe	-	< 2,5	2,5 - 4,5	> 4,5	-

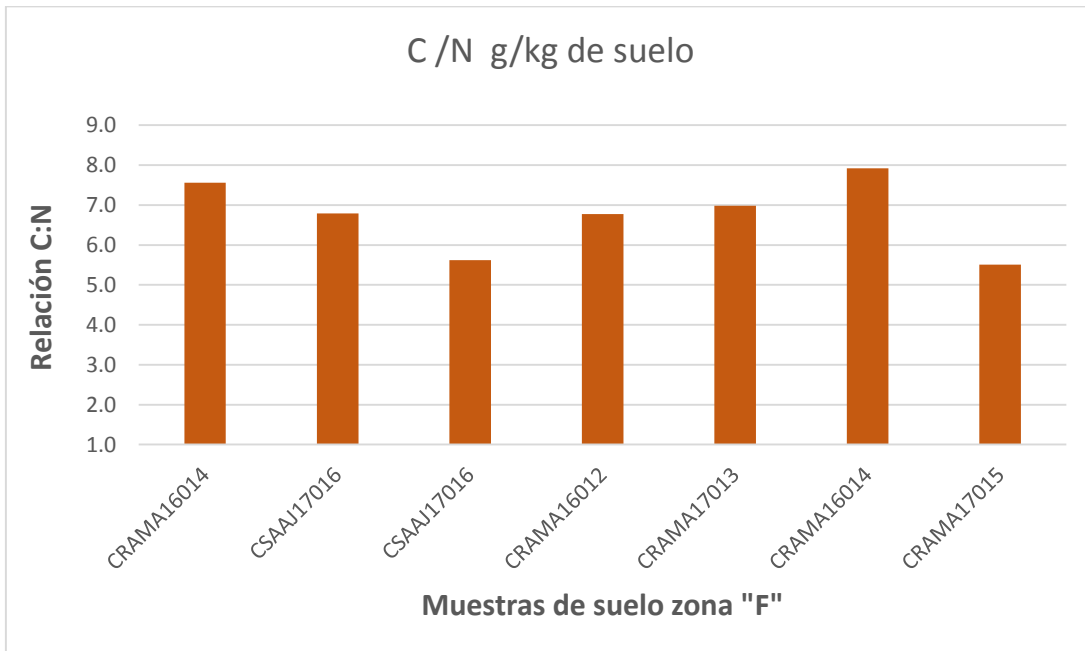
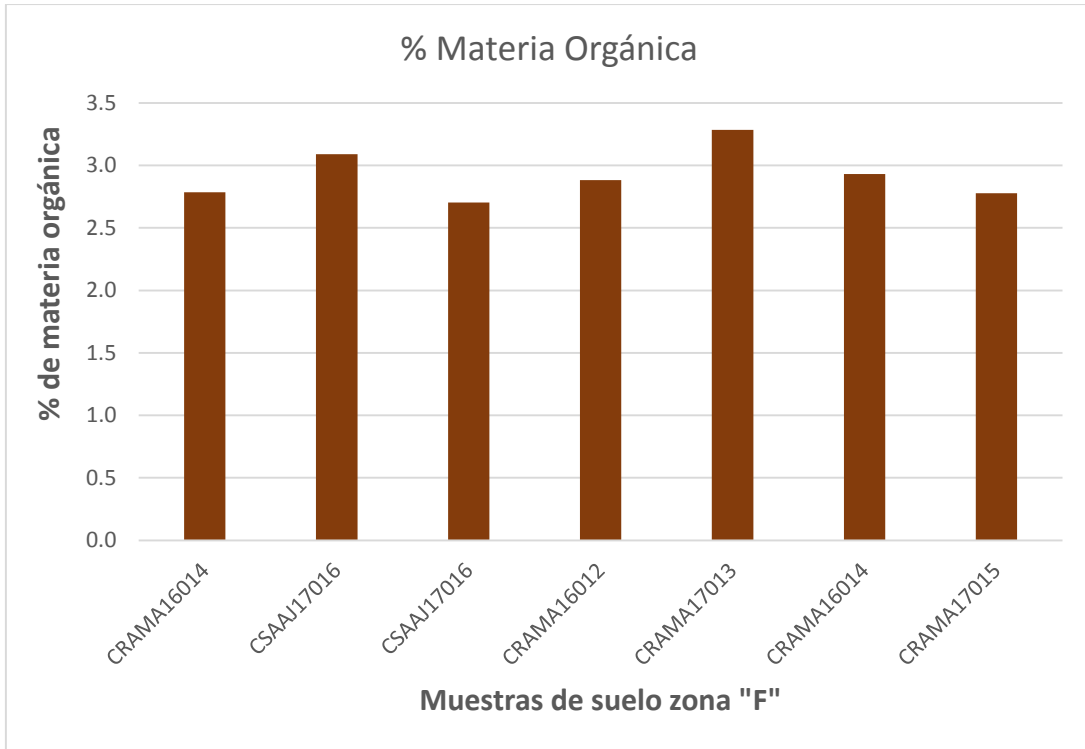
Valores en ppm

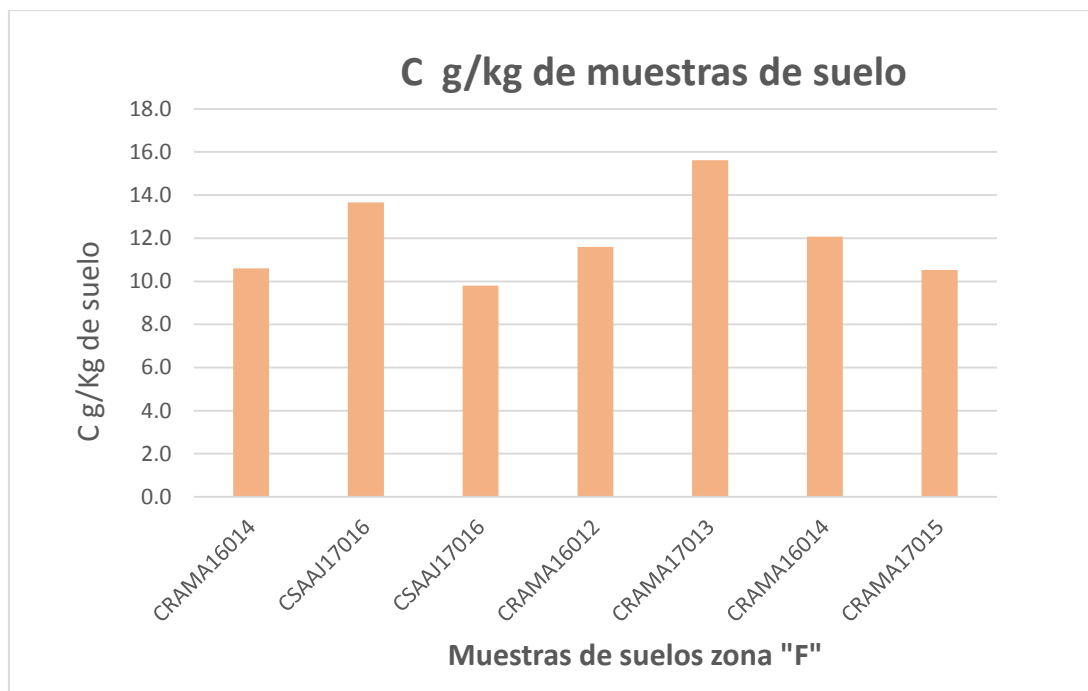
La primera etapa de este trabajo consistió en determinar las condiciones del suelo desde el pH hasta los contenidos nutrimentales para el desarrollo del cultivo de manzana.

A continuación se mencionan algunas de las condiciones encontradas en suelos que por tradición se habían utilizado para el cultivo de hortalizas y que a partir de este análisis se utilizarán para la introducción de manzana en la región, se encontró que existen necesidades de fertilización química y la búsqueda de alternativas orgánicas para la recuperación de la fertilidad del suelo, para esto se utilizarán cultivos alternos que ayuden a la fijación de nitrógeno y a la acumulación en suelo (alfalfa y trébol blanco), así como la utilización de materiales composteables tales como desechos de materia orgánica mezclados con gallinaza y desechos de residuos tales como rastrojos.

A continuación se muestran algunos de los datos obtenidos en cuanto a valores nutrimentales en suelos de Tepetitla de Lardizabal.







En la comercialización se observa, por un lado, un limitado acceso a los insumos y servicios necesarios a nivel local tanto para la producción primaria como para la transformación (por falta de información y de recursos económicos), lo que afecta estos procesos productivos. Por otro lado, existe un alto grado de participación de intermediarios y una marcada inconciencia por el uso de aguas rodadas residuales del río Atoyac para regar sus cultivos, lo que se refleja en precios muy bajos de sus productos.

Como el valor obtenido por los intermediarios en el proceso de venta de los productos es del doble que el generado por el productor, se plantea la necesidad de innovar producción de buena calidad asociada con mejor manejo y uso de tecnologías mejoradas, y/o el de la integración de los productores con procesadores, comerciantes y el mercado directo, para que obtengan mejores precios, y por consiguiente, se reduzcan los márgenes de ganancia de los otros actores involucrados en la cadena productiva.

También se cuenta con experiencias externas e información técnica y de mercados que permiten plantear soluciones a la problemática frutícola anterior en los componentes de producción, industrialización y comercialización. En el aspecto productivo se puede mencionar el ejemplo de los productores de manzana de Chihuahua, quienes utilizan técnicas de manejo y variedades adecuadas al cultivo y a esa condición, riego vertical presurizado para control de heladas, malla antigranizo, cosecha manual-mecánica, etcétera.

Un área de oportunidad en la región es la producción de sidra y derivados, se continúan instalando en diferente magnitud durante cada temporada de cosecha; fabricantes de sidra; procesadores de conservas de frutas y verduras, y viveristas pequeños y medianos que propagan árboles frutales injertados con variedades mejoradas. En total se estima que hay más de 40 pequeñas y medianas empresas que se ubican en el sector secundario, además de una serie de fábricas familiares de sidra que procesan anualmente alrededor de 900 toneladas de manzana.

Propuesta de un plan de acción innovador

Con base en las posibilidades de comercialización, las condiciones de producción disponibles y algunas características de los productos locales como su calidad, originalidad, localidad y tipicidad (Comisión Europea, 2005), se seleccionaron cuatro especies frutícolas a las que se orienta la estrategia de innovación: durazno, manzana, ciruelo y nogal.

Para cada especie deben formularse objetivos, medidas tendientes a las ayudas y acciones que integran la estrategia de desarrollo del sector frutícola están orientadas al aspecto aglutinante siguiente: la valorización de los recursos y productos locales, encaminada a recuperar el interés de los productores y otros actores en las actividades frutícolas indicadas, y particularmente en la manzana de alta densidad y en variedades más adaptables según resultados de estudio en el presente proyecto, ante los avances en la zona en cuanto a su manejo y desarrollo tecnológico de esta especie. Los objetivos no se definen en este trabajo, mientras que las medidas se orientan al incremento del valor añadido mediante acciones organizadas de producción, industrialización y la comercialización de los productos frescos y hasta procesados.

En tanto que las propuestas de acciones innovadoras sobre la valorización de los productos locales están orientadas, de manera general, al aprovisionamiento de insumos, equipo e infraestructura; a proporcionar los servicios de información tecnológica, asesoría, capacitación, formación profesional, empresarial y administrativa; a la promoción de tecnologías de producción (huertos simples e intercalados) y procesos de comercialización (marcas, participación en foros, congresos exposiciones y ferias); a estudios de mercado y de tecnología alimentaria; a la búsqueda de esquemas de financiamiento y formas de cooperación e integración de los actores, conectando la producción primaria y secundaria y a éstas a su vez con el mercado; y sin pasar por alto el fomento de las pequeñas y medianas empresas, entre otras.

Lo que requeriría de la conjunción de esfuerzos entre productores y otros actores con los Ayuntamientos (recursos municipales), los expertos de Chihuahua, la Secretaría de Desarrollo Rural (varios apoyos), la SAGARPA (información comercial y de mercados), la Fundación Produce (financiamiento, demostración), y el CIBA-IPN Tlaxcala.

La factibilidad de dichas acciones, de acuerdo con cifras oficiales del INEGI, se apoya en el planteamiento de que en el territorio se cuenta con un potencial frutícola de siete mil hectáreas de las 20 mil laborables, de las cuales más de 2200 son de riego, en donde se podría beneficiar a más de cuatro mil familias y una población aproximada de 24 mil habitantes (Bock *et al.*, 2004), así como generar alrededor de 8300 empleos permanentes con acciones dirigidas al sector primario de dicho potencial frutícola (cálculo a partir de Mendoza *et al.*, 1999), adicionales a los empleos que puedan generarse en los procesos de transformación y comercio.

Organización en la comercialización

Con esto se busca acercar a los productores con los demás actores (proveedores de insumos y equipo, procesadores, comercializadores y otros microempresarios), para lograr un mayor acceso de los productores a los servicios para la producción y al mercado de los productos. Asimismo, el acceso a la información institucional disponible en el territorio en relación con los planes de acción tecnológicos con que se cuenta en los distintos procesos, así como a la información de programas de apoyo financiero y técnico. Pero también con las bases de datos que se encuentran en la red de Internet sobre el comercio y mercado de los insumos y productos, como aquellas disponibles en el sistema de información empresarial mexicano (SIEM, 2003) y el sistema nacional de información e integración de mercados (SECOFI, 2001), entre otras.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos hasta este avance en su primera etapa, ponen de manifiesto que el cultivo del manzano en agricultura ecológica es factible, aunque requiere un elevado grado de conocimiento del funcionamiento del agroecosistema y de no pasar por alto el Plan de negocio junto con su correspondiente Estudio de mercado.

En el momento de diseñar la plantación, debe considerarse la opción de utilizar variedades resistentes de buena calidad organoléptica, como sistema base para el control fitosanitario ya que facilitará en gran medida el manejo ecológico de la plantación. La revisión de las características físicas, sociales y económicas de zona de Tepetitla y alrededores permite definir el ámbito de actuación para la propuesta de aplicación de una estrategia de valorización de los productos frutícolas locales.

La caracterización de la producción frutícola muestra que sus ineficiencias están relacionadas con un manejo técnico no adecuado de los huertos simples e intercalados, aun cuando se dispone de tecnologías de producción locales, con procesos de industrialización y formas de organización que antes fueron incipientes, aun cuando se dispone de tecnologías de producción locales, mercados

externos, tecnología alimentaria y procesos participativos que pueden mejorar su productividad, rentabilidad y desempeño.

El análisis de valorización de la actividad frutícola provee información sobre la magnitud de cómo se comporta cada sector productivo, de tal manera que los procesos alternativos de producción e industrialización prácticamente triplican y que por experiencia de expertos en mercadotecnia el de comercialización duplica el valor de la producción asociado a cada uno de los procesos convencionales, los cuales pueden mejorarse mediante este tipo de el desarrollo de actividades productivas.

Es por esto y otros factores, que se considera viable una propuesta de estrategia de valorización de la producción local frutícola, que considera los elementos siguientes: definir y actuar en un ámbito territorial, tomar en cuenta a los pobladores para conocer sus demandas y apoyar sus iniciativas, propuesta de un plan de acción en forma de un programa de innovación sustentable, formas de organización e integración de los actores para la producción y comercialización, y operación del programa que incluye apoyo técnico y fuentes de financiamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. AEIDL (Asociación Europea de Información sobre el Desarrollo Local). 1995. La valorización de recursos agrícolas locales: La experiencia de LEADER I. Cuadernos Alier G., J. L., I. De los Ros C., J. M. Díaz P., y J. L. Yagüe B. 2002. La planificación del desarrollo en la iniciativa LEADER plus: Programas de innovación en diversas regiones. *In*: Innovación para el desarrollo rural: La iniciativa LEADER como laboratorio de aprendizaje.
2. Bock S., Y., N. Pérez R., A. Argumedo M., J. Regalado L., J. I. Olvera H., y R. Mendoza R. 2004. Proyecto de desarrollo rural en la región oriente de la Sierra Nevada (Puebla). Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. 112 p.
3. Cazorla M., A., I. De los Ríos C., y J. M. Díaz P. 2005. La iniciativa comunitaria LEADER como modelo de desarrollo rural: Aplicación a la región capital de España. *Agro ciencia* 39: 697-708.
4. Comisión Europea. 2005. Tema central: Valorización de la producción local. LEADER Magazine 3: 9.
5. De los Ríos C., I. (coord.). Ed. Comunidad de Madrid. pp: 139-174.
6. Dixon, J., A. Gulliver, y D. Gibbon. 2001. Compendio: Sistemas de producción agropecuaria: Cómo mejorar los medios de subsistencia de los pequeños agricultores en un mundo cambiante. Hall, M. (ed). FAO y Banco Mundial. 50 p.
7. Iglesias, I.; Carbó, J.; Bonany, J.; Monserrat, R., 2009. Innovación
8. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), Encuesta Intercensal 2015
a. varietal en manzano. *Revista de Fruticultura*, 1, 13–25.
9. Knudson, W., A. Wysocki, J. Champagne, and C. Peterson. 2004. Entrepreneurship and innovation in the agri-food system. *Amer. J. Agr. Econ.* 86: 1330-1336.
10. Mendoza R., R., E. Hernández R., J.I. Cortés F., A. Turrent F., L.A. Lerma V. y E. Aceves R. 1999. Inclusión del durazno mejorado en el sistema de producción de cultivos básicos para aumentar las productividades de la tierra y del trabajo. *In*: Memoria del IV Simposio Internacional y V Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible. De la Isla, de B.M.L., L. Tijerina C., C. Rodríguez H. y F. Escobedo C. (eds). Morelia, Mich., México. p.p: 223-229.
11. Mendoza R., Parra F. De Los Ríos I. 2004. La actividad frutícola en tres municipios de la Sierra Nevada en Puebla: características, organizaciones y estrategia de valorización para su desarrollo. San Pedro Cholula, Puebla., México.
12. SAGARPA. Estudio de los componentes de desarrollo de mercado. 2017.
13. SECOFI (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial). 2001. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM). México. http://www.secofi-sniim.gob.mx/e_default.asp.
14. SIEM (Sistema de Información Empresarial Mexicano). 2003. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Secretaría de Economía. México. <http://www.siem.gob.mx>

OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE SEMILLAS DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM*)

Paola Mateo Roque, Gema Morales Olán y Silvia Luna Suárez

Instituto Politécnico Nacional - CIBA

RESUMEN

Solanum lycopersicum, conocido como tomate o jitomate en México, es uno de los cultivos hortícolas más importantes del mundo. La planta, produce un fruto rojo y carnoso que puede consumirse fresco o procesado. Se estima que al menos un tercio de su producción se consume en forma de productos procesados como pasta, ketchup, etc. Sin embargo, durante la manufactura del tomate se generan residuos sólidos: cascaras y semillas. A la mezcla de estos residuos se le llama orujo de tomate. Si los residuos no se tratan adecuadamente, pueden causar problemas ambientales. Debido a esta situación, se han buscado alternativas de uso de semilla. Estudios anteriores han reportado que las semillas contienen 22.2-33.9% de proteína en base seca. Es por ello que, el objetivo del trabajo fue estandarizar un método de extracción de proteínas de semillas de tomate, utilizando NaCl y urea. Primero, se determinó el análisis proximal de semilla de tomate. Posteriormente, se diseñaron tres tratamientos de extracción de proteína: NaCl 1M pH8 a 50°C (A), NaCl 1M pH 6.52 temperatura ambiente de 25°C (B) y Urea 6M-NaCl 0.5M pH9 (C) a 50°C. Las extracciones proteicas se analizaron mediante SDS-PAGE. Se determinó que la semilla de tomate usada en este trabajo contenía 41.62%±2.62 de proteína en base seca, encontrándose diferencia significativa entre tratamientos ($P<0.05$). Se observó que el tratamiento B extrajo 42.61% de proteína total, seguido de A, 33.83% y C, 21.04%. El SDS-PAGE reveló que, el tratamiento C presentaba ocho bandas de proteínas en mayor abundancia, mientras que A y B, siete. Las proteínas identificadas tenían pesos moleculares de 44.5 a 10 KDa. Se encontró que las semillas de tomate son una fuente rica en proteínas y el 42.61-33.83% son solubles en NaCl 1M.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum Lycopersicum*) es el segundo vegetal más producido a nivel mundial (Hameed et. al., 2014). Se ha estimado que un tercio de su producción es destinado a consumo en productos procesados, por ejemplo, jugo de tomate, pasta, ketchup, salsa, etc (Shao et.al., 2013). Sin embargo, durante el proceso de extracción de jugo o pulpa se generan residuos sólidos orgánicos como cascaras, semillas, materia fibrosa, recortes y tomates de desecho (Sogi et. al., 2005). Estos residuos son usados para la producción de piensos de ganado, o arrojados a vertederos. Una limitación que dificulta el almacenamiento de residuos es su alto contenido de humedad, por lo que se debe evitar su fermentación (Celma et. al., 2009), de lo contrario, pueden ocasionar problemas ambientales. Se ha estimado que las semillas corresponden el 60% de residuos totales. Debido a la problemática de acumulación de residuos, se han realizado investigaciones orientadas a las semillas, donde se ha encontrado que contienen 22.2-33.9% de proteína en base seca (Sogi et al., 2002). Debido a lo anterior, el objetivo del trabajo fue estandarizar un método de obtención de proteínas de semilla de tomate utilizando NaCl y urea.

TEORÍA

Las proteínas son las más variadas de todas las macromoléculas, y cada célula contiene miles de proteínas diferentes. Las funciones que realizan las proteínas incluyen: servir como componentes estructurales de células y tejidos, actuar en el transporte y almacenamiento de pequeñas moléculas (transporte de oxígeno por la hemoglobina), transmitir información entre células (hormonas proteicas), catalizar reacciones químicas y proporcionar una defensa frente a una infección (anticuerpos) (Cooper et. al., 2010).

Estructuralmente, las proteínas son polímeros constituidos por monómeros de aminoácidos; la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional y en última instancia, la función de la proteína. Osborne desarrolló una clasificación de proteínas de plantas, basada en su solubilidad en una serie de solventes, por ejemplo, las albuminas son solubles en agua, globulinas en soluciones salinas diluidas, etc. (Shewry y Halford, 2002).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*), variedad saladette, provenientes del Estado de Puebla. Las semillas fueron lavadas con agua destilada y secadas al aire a temperatura ambiente de 25°C. Se adquirieron reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS PAGE) de Bio-Rad. El marcador usado en electroforesis fue PageRuler Unstained Protein Ladder. Se utilizó NaOH en forma de lenteja y urea marca Meyer, NaCl y HCl marca J. T. Baker. Se utilizó agua destilada como disolvente en todos los experimentos.

Métodos

Se determinó el contenido de proteína por el método Kjeldahl (AOAC), utilizando un factor de conversión de proteínas de 6.25.

Obtención de proteínas. Se compararon tres tratamientos de extracción de proteínas: (A) NaCl 1M pH8 a 50°C (sugerido por Sarkar et. al., 2016), (B) NaCl 1M pH 6.52 temperatura ambiente de 25°C y (C), Urea 6M-NaCl 0.5M pH9 a 50°C. La obtención de proteína consistió en mezclar harina no desgrasada con la solución (según fuera el tratamiento), en una relación 1:10. Posteriormente, la mezcla se agitó por una hora, a pH y temperatura de acuerdo al protocolo correspondiente. Luego, se centrifugó la suspensión a 13,000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se recogió y se cuantificó la proteína soluble en mg/mL mediante la técnica de BCA (García Arellano y Vazquez Duhalt, 1998).

El rendimiento de proteína obtenida (%PE) se definió como:

$$\text{Proteína Extraída(\%)} = (\text{Proteína total extraída} \times 100) / \text{Proteína total de semilla}$$

Ecuación 1

Los resultados se graficaron en función al rendimiento vs tratamiento

Análisis electroforético. Los extractos proteicos de cada tratamiento fueron preparados para SDS-PAGE con buffer de carga que contenía β -mercaptoetanol y desnaturalizadas a 95°C. Se realizó la determinación del perfil proteico mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 14%. Se cargaron 10 μ g de proteína en cada pocillo y se corrieron a 100 voltios, hasta que el colorante de seguimiento alcanzó el fondo del gel. Por último, el gel se retiró y se tiñó con solución de tinción azul Coomassie, pasado el tiempo, se retiró el colorante y se colocó una solución desteñidora.

Análisis estadísticos. Las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software SAS System (versión 9.0) y GraphPad Prism 7. Las diferencias se consideraron significativas cuando se obtuvo $P < 0.05$. Se realizaron pruebas de Tukey (mismas letras, tratamientos estadísticamente iguales; letras diferentes: tratamientos estadísticamente diferentes).

RESULTADOS

Contenido de proteína. Se determinó que las semillas de tomate contenían 41.62g proteínas/100g de semilla seca. El valor proteico determinado es alto, comparado a lo reportado por otros autores (Shao y col., 2013; Al-Wandawi et. al., 1985).

Las semillas de tomate son una fuente rica en proteínas, similar a las encontradas en soya (43.9g de proteína/100g de semilla seca) (Pomeranz, 1985). En un estudio publicado por Sarkar y Kaul (2014) reportaron que el 35.5% de aminoácidos presentes en proteínas de semillas de tomates son esenciales. Esta información es importante, debido a que proteínas de semillas de tomate podrían ser aisladas para enriquecer o fortificar algún producto alimenticio.

Obtención de proteínas. En la figura 1 se muestra el rendimiento de proteína total extraída de semilla de tomate. Se identificó diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$), encontrándose como mejor tratamiento B, seguido de A y C. El porcentaje de rendimiento obtenido por el método B fue de 42.73 ± 4.16 . Este valor es similar a lo reportado por Liadakis et. al. (1995). Ellos obtuvieron un rendimiento del 41.2%, a partir de agua alcalina.

Se encontró que el tratamiento A obtuvo 33.93 ± 0.08 de proteína total. A pesar de que los tratamientos A y B tenían la misma concentración de NaCl, el tratamiento A, sugerido por Sarkar et. al. (2016). fue 0.2 veces menor a B.

Se determinó que el tratamiento C obtuvo el rendimiento más bajo de 21.10 ± 1.6 . Este resultado es similar a lo reportado por Liadakis et. al. (1998), donde obtienen un rendimiento de 20.2% a partir de una solución de NaCl. De acuerdo a la clasificación de Osborne, las proteínas obtenidas en este trabajo fueron globulinas.

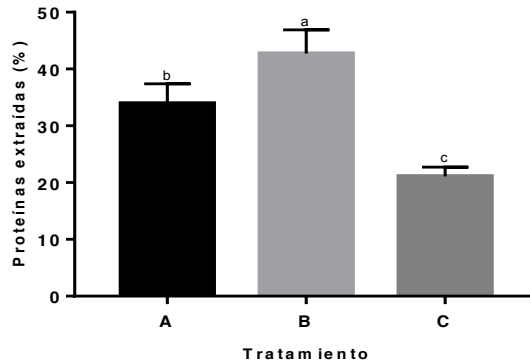


Figura 1. Rendimiento de extracción de proteínas de tratamientos (A) NaCl 1M pH8 a 50°C (sugerido por Sarkar et. al., 2016), (B) NaCl 1M pH 6.52 temperatura ambiente de 25°C y (C), Urea 6M-NaCl 0.5M pH9 a 50°C.

Análisis electroforético.

En la figura 2 se muestra el SDS-PAGE de las proteínas o subunidades que se obtuvieron en cada tratamiento.

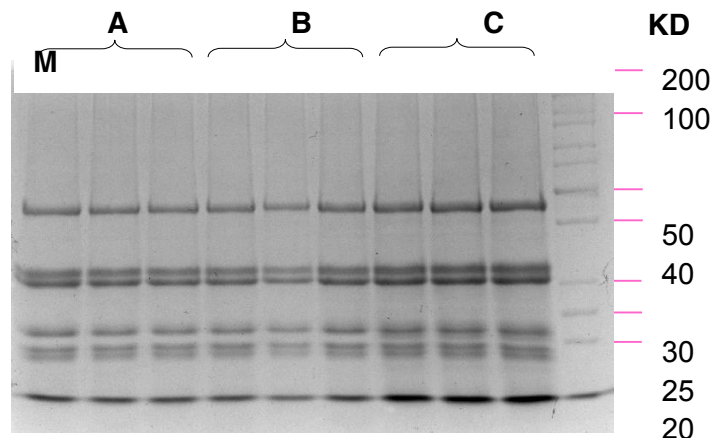


Figura 2. SDS-PAGE de proteínas obtenidas con los tratamientos (A) NaCl 1M pH8 a 50°C (sugerido por Sarkar et. al., 2016), (B) NaCl 1M pH 6.52 temperatura ambiente de 25°C y (C), Urea 6M-NaCl 0.5M pH9 a 50°C. (M) marcador.

Sin importar la diferencia de pH y temperatura, en los tratamientos A y B, se encontraron siete bandas de proteínas con pesos de 42.9, 31, 29.8, 21.4, 19, 18.4 y 15 kDa. Estos resultados son similares a lo reportado por Sarkar et. al. (2016). Con el tratamiento C, el cual contenía urea, se obtuvieron ocho bandas de proteínas de 42.9, 31, 29.8, 21.4, 20.5, 19, 18.4 y 15 kDa.

La urea es un compuesto que tiene la capacidad para interactuar con los componentes polares y no polares de las proteínas (Rossky, 2008).

Se pudo analizar que a concentración de 0.5 o 1M de NaCl, se obtienen proteínas de mismo peso molecular.

CONCLUSIONES

El 42.6% de proteínas totales se obtuvieron con NaCl 1M, en SDS-PAGE se observaron siete bandas de proteínas, mientras que con urea, ocho.

BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Wandawi, H., Abdul-Rahman, M., & Al-Shaikhly, K. (1985). Tomato processing wastes as essential raw materials source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 804-807.
2. Amjad, H., Ayesha, G., & Tahsin, G. (2014). Characterization of tomato germplasm through seed storage protein profiling by sds-page. *Pakistan Journal of Botany*, 827-832.
3. AOAC. (1990). Official method of analysis. Washington:: Association of Official Analytical Chemists.
4. Celma, A. R., Cuadros, F., & López-Rodríguez, F. (2009). Characterisation of industrial tomato by-products from infrared drying process. *Food and Bioproducts Processing*, 282–291.
5. Cooper, G. M., & Hausman, R. (2010). *La célula*. Madrid, España: Marbán.
6. García Arellano, H., & Vázquez Duhalt, R. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. *Bio tecnología*, 1-12.
7. Liadakis, G. N., Tzia, C., Oreopoulou, V., & Thomopoulos, C. D. (1995). Protein Isolation from Tomato Seed Meal, Extraction Optimization. *Journal of Food Science*, 477-483.
8. Liadakis, G. N., Tzia, C., Oreopoulou, V., & Thomopoulos, C. D. (1998). Isolation of Tomato Seed Meal Proteins with Salt Solutions. *Chemistry/Biochemistry*, 450-453.
9. Pomeranz, Y. (1985). Functional properties of food components. *Food Science and Technology*, 1-538.
10. Rossy, P. J. (2008). Protein denaturation by urea: Slash and bond. *PNAS*, 16825–16826.
11. Sarkar, A., & Kaul, P. (2014). Evaluation of tomato processing by-products: a comparative study in a pilot scale setup. *Journal of Food Process Engineering*, 299–307.
12. Sarkar, A., Kamaruddin, H., Bentley, A., & Wang, S. (2016). Emulsion stabilization by tomato seed protein isolate: Influence of pH, ionic strength and thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, 160-168.
13. Shao, D., Atungulu, G., Pan, Z., Yue, T., Ang Zhang, A., & Fan, Z. (2013). Characteristics of Isolation and Functionality of Protein from Tomato Pomace Produced with Different Industrial Processing Methods. *Food Bioprocess Technol.*
14. Shewry, P. R., & Halford, N. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 947–958.
15. Sogi, D., Arora, M., Garg, S., & Bawa, A. (2002). Fractionation and electrophoresis of tomato waste seed proteins. *Food Chemistry*, 449–454.
16. Sogi, D., Bhatia, R., Garg, S., & Bawa, A. (2005). Biological evaluation of tomato waste seed meals and protein concentrate. *Food Chemistry*, 53–56.

ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA DE TOSTADAS A BASE DE MAÍZ (ZEA MAYS L) ADICIONADAS CON BROCOLÍ (BRASSICA OLERACEA I)

Porras-Saavedra Josefina*, Hernández-Santiago Evelyn, Pérez-Pérez Nalleli Concepción, Tovar-Benítez Tomas

Instituto Tecnológico Superior del Occidente del Estado de Hidalgo, Paseo del Agrarismo 2000, Carretera Mixquiahuala-Tula, km 2.5, Mixquiahuala de Juárez, CP 42700 Hidalgo, México. Email: jporras@itsoeh.edu.mx

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue analizar la textura de tostadas de maíz adicionadas con brócoli a fin de determinar su aceptabilidad sensorial. La metodología, se estableció un diseño experimental completamente al azar utilizando como variable independiente la concentración de brócoli 0 %, 14 %, 28 % y 36 % para la obtención de las tostadas y las variables respuesta fue el contenido de humedad y el análisis de perfil de textura (APT). Los resultados evidenciaron que la incorporación de brócoli reduce la dureza de 28.51 a 3.7 N y la gomosidad; sin embargo no se observaron diferencias significativas en la elasticidad y masticabilidad. Durante el almacenamiento a 75 % HR, se incrementa el contenido de humedad mientras que los parámetros de textura como fracturabilidad, dureza, cohesividad, elasticidad y gomosidad son afectados. En conclusión, con la incorporación del 28 % de brócoli se obtienen tostadas con características de textura aceptables para los consumidores y se determinó que el almacenamiento en humedades relativas del 75 % afecta estos parámetros.

INTRODUCCIÓN

En México, la elaboración de tortilla de maíz y productos derivados de este en constituye una actividad compleja. Este producto ha trascendido, para erigirse en actividad agroindustrial que involucra competencia tecnológica, estrategias de mercadeo, reorientación de preferencias de los consumidores. Las tortillas elaboradas en forma tradicional se caracterizan por su sabor, sus propiedades texturales (Gasca-Mancera y Casas-Alencaster, 2007). En México, la tostada es una tortilla dorada de consistencia crujiente y de textura áspera; es una comida simple pero tiene varias aplicaciones en la cocina Mexicana; las tostadas se usan para acompañar platillos Mexicanos, está elaborada principalmente de maíz (*Zea mays*). Sin embargo, el consumidor se ha acostumbrado a consumir, generalmente por facilidad, diferentes tipos de tortilla adicionada con componentes que proveen un beneficio a la nutrición, en esta investigación se propone la incorporación de brócoli (*Brassica oleracea* I). El brócoli es una fuente muy importante de fibra, recomendada en dietas hipocalóricas donde exista una mejor proporción de aporte de nutrientes con respecto al bajo aporte energético en cuanto a minerales (Greenfield, 2006). Los alimentos al ser modificados por la incorporación de algún componente, sufren cambios en su textura que modifica su aceptabilidad.

La textura es un atributo de calidad utilizado en la industria de los alimentos, tanto frescos como procesados, para analizar la aceptabilidad y la calidad, los factores contribuyentes de la textura pueden ser evaluados por análisis descriptivos sensoriales o instrumentales. El método instrumental utilizado con mayor frecuencia es el análisis de perfil de textura, este método imita las condiciones a que se somete el material durante el proceso de masticación. Este tipo de análisis presenta las ventajas de ser objetivos, con mínimas variaciones y pueden determinarse parámetros como gomosidad, masticabilidad, dureza (Torres-Gonzales et al., 2014). La información textural es importante en el diseño de procesos de transformación en alimentos: mezclado, flujo de materiales, calentamiento, enfriamiento; en la determinación de la funcionalidad de los ingredientes para el desarrollo de productos intermedios y finales, en pruebas de tiempo de vida útil y en evaluaciones de propiedades texturales correlacionadas con pruebas sensoriales (Rodríguez-Sandoval et al., 2005). El objetivo de esta investigación fue analizar la textura de tostadas de maíz adicionadas con brócoli a fin de determinar su aceptabilidad sensorial.

METODOLOGÍA

Para evaluar el efecto de la incorporación del brócoli se estableció un diseño experimental completamente al azar utilizando como variable independiente la concentración de brócoli 0 % (F00),

14 % (F114), 28 (F228) y 36 % (F336) para la obtención de las tostadas y las variables respuesta fueron el contenido de humedad y el análisis del perfil de textura (APT).

Para la obtención de las tostadas se realizó un mezclado de brócoli (*Brassica oleracea* L) con masa de maíz nixtamalizado y H₂O. Posteriormente se laminó, se realizó la pre cocción a 45 °C en una superficie de acero inoxidable y el horneado fue a 180 °C (Shel Lab, EUA), con tiempos preestablecidos de 20 minutos. Una vez obtenidas las tostadas se almacenaron en bolsas de polietileno hasta su análisis.

Determinación de humedad:

Se pesó 0.5 g de muestra en una balanza analítica (XT 220^a, Precisa, Suiza) y se colocaron en la estufa (Gp-125 B, Biobase, México) a 100+1°C hasta peso constante (AOAC, 2005). El contenido de humedad se determinó de acuerdo a la ecuación 1.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

Ecuación 1

Análisis de Perfil de Textura de las tostadas:

La prueba de quiebre de tres puntos corresponde a una prueba de ruptura y consiste en evaluar la fuerza máxima necesaria para producir un quiebre total de la estructura del producto. El análisis se realizó en un texturómetro Texture Pro CT Software Brookfield utilizando la geometría TA-TPB, con una velocidad de 10.00 mm/s y 2 ciclos. La prueba instrumental de perfil de textura consistió en colocar la muestra de la tostada sobre la base que consta de dos partes fijas y una parte móvil por medio de la cual se simula la fuerza ejercida de la mandíbula humana y la fuerza que se aplica para realizar el quiebre de la muestra (Alviz, 2011).

Evaluación de los parámetros de textura de la tostada almacenados a humedad relativa del 75 %:

Para determinar los parámetros de textura en función a la humedad relativa, las formulaciones denominadas como F00, F114, F228 y F336 se almacenaron en recipientes sellados herméticamente a 25 °C con humedad relativa del 75 %, hasta alcanzar el equilibrio (Granados, 2014). Posteriormente se determinó el contenido de humedad y el análisis de perfil de textura con los métodos descritos previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las tostadas son de forma circular con un diámetro promedio de 7 cm y 2 mm de espesor. El proceso de cocción fue por horneado, en este proceso, el fluido de contacto es el aire a alta temperatura para transferir el calor de 180 a 200 °C, muy superior a la temperatura de ebullición del agua. Los alimentos horneados tienen buen sabor y desarrollan durante el proceso una corteza dorada y crocante por la deshidratación superficial. De acuerdo a lo reportado por Arámbula (2012), se recomienda un contenido de humedad del 48 al 55 %. En el desarrollo de las tostadas (Tabla 1), el contenido de la masa con distintas concentraciones de brócoli oscila en un intervalo de 40.86 a 46.22 % valores cercanos a los reportados por Arámbula (2012); en el pre horneado se evapora del 19 al 25 % de humedad respecto al contenido inicial, en la etapa final del tratamiento térmico, es decir en el horneado se elimina del 75 % al 92 % de agua, siendo la formulación F336 (36 % de brócoli) la que retiene 7.86 % de agua.

Tabla 1. Determinación de humedad de tostadas horneadas adicionadas con brócoli, expresada en %.

Formulaciones	Masa con brócoli	Pre cocción	Horneado (T0)	47días/25°C/ 75%HR
F00	42.14±3.62 ^a	33.30±1.88 ^a	3.23±0.42 ^a	8.32±0.43 ^a
F114	46.22±3.68 ^a	34.14±4.40 ^a	3.60±2.22 ^a	5.59±1.03 ^a
F228	40.86±5.14 ^a	31.51±0.61 ^a	7.86±2.82 ^a	7.21±0.43 ^a
F336	40.99±3.99 ^a	31.98±2.70 ^a	10.16±2.20 ^b	6.25±0.54 ^a

Se indica la media y desviación estándar de tres repeticiones. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencias significativas, intervalo de confianza 99 % utilizando la comparación de medias de Tukey.

El perfil de textura es un procedimiento instrumental para medir, cuantificar y desarrollar nuevos parámetros relacionados con la textura, aunque la magnitud de estos parámetros son influenciados por variables como composición, contenido de agua, actividad de agua y temperatura de almacenamiento son dependientes del tiempo (Arámbula, 2012). La textura se evaluó por compresión hasta su ruptura, se registró la distancia máxima recorrida por el punzón. En la primera compresión del análisis de perfil de textura, se determinó que la fuerza necesaria para deformar la tostada sin brócoli es de 28.51 N (Tabla 2), es decir presenta un mayor valor de dureza comparada con las formulaciones en las que se incorpora brócoli. En este parámetro muestra una tendencia lineal con una pendiente negativa y $R^2 = 0.9051$, por lo tanto el incremento en la concentración de brócoli es inversamente proporcional a la dureza durante el primer ciclo. Como se observa en la Tabla 2, al incrementar la concentración de brócoli se requiere menor fuerza para su deformación, probablemente la incorporación de la fibra del brócoli en la tortilla interviene en la unión de los gránulos del almidón durante la gelatinización. Por otro lado, los cambios que el almidón sufre durante la nixtamalización retardan la gelatinización debido a la aparente interacción del calcio con el almidón, especialmente con la amilosa (Paredes-López et al., 2008). El almidón de maíz alcanza un grado de gelatinización por efecto de la nixtamalización.

Tabla 2. Parámetros de textura de las tostadas después del horneado.

Formulación	Tratamientos			
	F00	F114	F228	F336
Ciclo 1 Dureza (N)	28.51 ± 1.5	13.2 ± 3.5	9.3 ± 0.8	3.7 ± 3.2
Deformación segundos 1/n dureza (mm)	1.5 ± 0.8	1.0 ± 0.5	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.7
%Deformación segundos 1/n dureza (%)	2.4 ± 1.3	1.7 ± 0.8	2.1 ± 0.4	1.4 ± 1.2
Cantidad de Fracturas	3.3 ± 0.6	2.3 ± 1.5	3.7 ± 1.5	1.3 ± 1.2
Fracturabilidad (N)	3.5 ± 3.4	13.2 ± 3.5	6.5 ± 5.6	3.7 ± 3.2
Ciclo 2 Dureza (N)	6.2 ± 4.3	4.8 ± 2.9	3.5 ± 0.6	2.70 ± 0.0
Cohesividad	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3
Elasticidad (mm)	10.2 ± 0.6	9.2 ± 2.7	9.2 ± 2.2	8.48 ± 0.0
Índice Elasticidad	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.5
Gomosidad (N)	5.3 ± 0.0	2.9 ± 0.14	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0
Masticabilidad (mJ)	55.7 ± 32.2	20.5 ± 5.1	30.8 ± 26.5	24.0 ± 0.0

Se indica la media y desviación estándar de tres repeticiones.

La fracturabilidad se expresa como la fuerza de una ruptura significativa en la curva a la primera mordida, la fuerza para fracturar las tostadas sin brócoli en el tiempo cero es de 2.9 N (Tabla 2). El Análisis de Perfil de Textura (APT) se relaciona con las mediciones basadas en la compresión y descompresión de una muestra dos veces, lo cual imita la acción de la mandíbula a la masticación. La dureza en el segundo ciclo evaluada en las tostadas testigo (0 % de brócoli) es de 6.2 N mientras que las tostadas con 36 % es de 2.7 N (Tabla 2). Los parámetros como son cohesividad y elasticidad y bajo las condiciones estudiadas presentan valores similares entre los tratamientos. Rodríguez-Sandoval describe que el comportamiento macroestructural de los alimentos depende de la microestructura, es decir de su composición espacial de sus componentes y de los tipos de enlace existentes.

Así mismo, se realizó el análisis de perfil de textura en las tostadas almacenadas durante 15 días en humedades relativas del 75 %, las muestras contienen de 6.25 a 8.32 % de humedad (Tabla 1), sin diferencias significativas entre sí. Sin embargo, la cantidad de agua es diferente antes y después del almacenamiento. De acuerdo a lo reportado por García Armenta (2016), menciona que el incremento

en el contenido de humedad, modifica la estructura de los alimentos, contribuye a la movilidad molecular de los carbohidratos, pierden su carácter crujiente y reducen su estabilidad.

Con este contenido de humedad, se observó que los parámetros como dureza en el primer ciclo y fracturabilidad se reducen al incrementar la concentración de brócoli. Sin embargo, la fuerza requerida para romper los enlaces internos de la estructura y que representa la cohesividad, es de 1.1 N en la formulación con 36 % de brócoli (Tabla 3). La elasticidad expresada como la capacidad de la tostada para que después de deformarse recupere su forma inicial es de 10 mm en la formulación con 28 %, e incrementa a 16 mm al incorporar 36 % de brócoli, esto indica que las tostadas son elásticas y se requiere de mayor fuerza para masticar. La gomosidad medida como la fuerza necesaria para desintegrar una muestra de alimento semisólido a un estado tal que facilite su ingesta es de 8.3N en las tostadas con 36 % de brócoli. La masticabilidad de las tostadas, es decir la fuerza necesaria para masticar un alimento sólido hasta un estado tal que permita su ingesta, se reduce al incrementar la concentración de brócoli y en el almacenamiento en humedades relativas de 75 % se requiere mayor fuerza necesaria para desintegrarlas.

Tabla 3 Parámetros de textura de las tostadas almacenadas a 25 °C a 75% de humedad relativa.

Parámetros	Tratamientos			
	F00	F114	F228	F336
Ciclo 1 Dureza (N)	18.5 ± 5.3	11.1±3.7	12.0 ± 1.1	7.9 ± 1.5
Deformación segundos 1/n Dureza (mm)	2.5 ± 0.9	2.3 ± 0.8	2.8 ± 0.4	2.9 ± 0.5
%Deformación segundos 1/n dureza (%)	4.0 ± 1.5	3.7 ± 1.3	4.5 ± 0.6	4.6 ± 0.8
Cantidad de Fracturas	2.7 ± 1.5	2.3 ± 0.6	3.0 ± 0.0	3.3 ± 1.5
Fracturabilidad (N)	18.1 ± 5.7	11.1 ± 3.7	12.0 ± 1.1	7.7 ± 1.7
Ciclo 2 Dureza (N)	6.6 ± 6.6	7.4 ± 2.5	5.4 ± 5.2	6.8 ± 1.4
Cohesividad	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.5	1.1 ± 0.3
Elasticidad (mm)	0.0 ± 0	13.3 ± 3.1	11.6 ± 5.8	12.2 ± 4.3
Índice Elasticidad	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.0
Masticabilidad (mJ)	31.0 ± 46.4	84.7 ± 68.0	120.8 ± 90.0	104.5 ± 47.5
Gomosidad (N)	0.7 ± 0.7	6.5 ± 3.5	5.7 ± 6.6	8.3 ± 1.4

Se indica la media y desviación estándar de tres repeticiones.

CONCLUSIONES

Con la incorporación del 28 % de brócoli se obtiene tostadas con características de textura aceptables para los consumidores y el almacenamiento en humedades relativas del 75 % afecta estos parámetros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alviz, A. (2011). Determinación de las Propiedades de Textura de Tabletas de Chocolate Mediante Técnicas Instrumentales. Colombia: Universidad de Cordoba.pp 60
2. Arámbula, V. (2012). Características del grano , masa y tortilla producida con diferentes genotipos de maíz del tropico mexicano. México, D.F.Universidad y Ciencia. pp 80.
3. AOAC. (2005). Official methods of analysis of AOAC Internacional (16th ed.) Gaythersburg, USA.
4. García-Armenta E., Téllez-Medina D. I., Sánchez-Segura L., Alamilla-Beltrán L., Hernández-Sánchez H., Gutiérrez-López G. F. (2016). Multifractal breakage pattern of tortilla chips as related to moisture content. *Journal of Food Engineering* 168, 96-104.

5. Gasca-Mancera J. C., Casas-Alencaster N. B. (2007). Adición de harina de maíz nixtamalizado a masa fresca de maíz nixtamalizado. Efecto en las propiedades texturales de masa y tortilla. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6(3) 317-328.
6. Granados, C. (2014). *Texture Profile Analysis in Bananas Pelipita, Hartón and Topocho*. Universidad de Cartagena: Ingeniería en Alimentos. pp 48
7. Greenfield, H. (2006). *Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización*. Española: FAO. pp 312
8. Paredes Lopez A., Guevara-Lara F., Bello Pérez, L. A. (2008). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*. 92-93, 60-70.
9. Rodríguez-Sandoval E., Fernández-Quintero A., Ayala-Aponte A. (2005). Reología y textura de masas: aplicaciones en trigo y maíz. *Ingeniería e investigación*, 25. 72-78.
10. Torres-González J. D., González-Morelos K. J., Acevedo-Correa D. (2014). Análisis del Perfil de Textura en frutas, productos cárnicos y quesos. *Revista ReCiTelA* 14 (2): 63-75.

EVALUACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN EL ACEITE DE ESCAMOL (*LIOMETOPUM APICULATUM MAYR*)

María Fernanda Escamilla-Rosales^{1*}, José Alberto Ariza-Ortega¹, María Elena Ramos-Cassellis², Joel Díaz-Reyes³, Nelly del Socorro Cruz-Cansino¹, Esther Ramirez-Moreno¹, Luis Delgado-Olivares¹, Arianna Omaña-Covarrubias¹, Zuli Guadalupe Calderón-Ramos¹, Ernesto Alanís-García¹, José de Jesús Manríquez-Torres¹, Luilli López-Contreras⁴.

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias de la Salud, Área Académica de Nutrición. Carretera Actopan-Tilcuautla, Ex-Hacienda la Concepción s/n, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo. 42086. México.

²Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ingeniería Química. Avenida San Claudio y 18 Sur, San Manuel. Puebla, Puebla. 72570.

³Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Ex-Hacienda de San Juan Molino Km. 1.5. Tepetitla, Tlaxcala. 90700.

⁴Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias de la Salud, Área Académica de Medicina. Carretera Actopan-Tilcuautla, Ex-Hacienda la Concepción s/n, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo. 42086. México. *Correo electrónico: 07fernanda.er@gmail.com

RESUMEN

Los escamoles contienen 32.65 % de lípidos y pueden aprovecharse para la obtención de aceite y ser utilizado para la diversificación de productos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos y químicos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad del aceite y de sus ácidos grasos insaturados en la pupa de *Liometopum apiculatum* Mayr (escamol) crudos y fritos. Para la extracción de los aceites, los escamoles crudos y fritos se molieron hasta obtener muestras homogéneas. Cada una de las muestras homogenizadas se depositaron dentro de cartuchos porosos y se introdujeron dentro de un equipo de Soxhlet (utilizando éter de petróleo a 40°C durante 4 h). La calidad de los aceites fue analizada por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (EITF) en la región del infrarrojo medio (400-4000 cm⁻¹). Los escamoles crudos y fritos presentaron una cantidad de 56% y 74% de aceite respectivamente. Con la EITF se identificaron números de onda a 723, 1654 y 3006 cm⁻¹ que corresponde a los dobles enlaces *cis* que contienen los ácidos grasos mono y poliinsaturados. Además, en ambos aceites no se observaron desplazamientos o cambios en las bandas de absorción a 1749 y 3468 cm⁻¹ por lo que los aceites no presentan ácidos grasos libres y oxidación respectivamente. Por lo tanto, el freído no ocasiona cambios significativos sobre los ácidos grasos insaturados y los aceites de escamoles pueden contener ácidos benéficos para la salud; como el oleico, linoléico y linolénico, que en literatura se ha reportado que mejora la fluidez de las membranas celulares, el riesgo de padecer cáncer de mama y colorrectal, diabetes, entre otros beneficios.

INTRODUCCIÓN

Los insectos contienen macromoléculas, en donde las proteínas (15-81%) y los lípidos (10-50%) son las principales. Sin embargo, los lípidos son poco analizados, por ejemplo en el escamol; que son las pupas de hormigas *L. apiculatum* que comienzan su ciclo como huevo, al eclosionar emerge una larva que pasa por cuatro estadios y después del cuarto estadio larval se transforma en pupa (escamol)¹. La palabra escamol es de origen náhuatl en donde azcatl es hormiga y molli es guiso; "guiso de hormiga"². En la Tabla 1 se muestra la comparación del análisis proximal de los escamoles.

Tabla 1. Análisis químico proximal de los escamoles en base seca.

Determinación	Hidalgo	México	Puebla
Proteínas	49.07	36.98	36.67
Lípidos	32.65	36.90	36.87
Cenizas	3.79	2.64	1.8
Fibra cruda	9.47	1.10	2.44
Carbohidratos	5.02	22.38	19.22

Ramos et al.³

En la Tabla 1 se observa que los constituyentes mayoritarios en el escamol son proteínas y lípidos, independientemente del Estado donde se recolecten.

PARTE EXPERIMENTAL

Los escamoles se compraron en el municipio de Santiago de Anaya; Hidalgo, México. El aceite de escamol se obtuvo de muestras crudas y fritas, estas últimas son la forma habitual de consumo en el Estado de Hidalgo.

Para la extracción de los aceites, las muestras de escamoles crudos y fritos se molieron hasta obtener muestras homogéneas. A continuación, cada una de las muestras homogenizadas se depositaron dentro de cartuchos porosos y se introdujeron dentro de un equipo de Soxhlet (utilizando éter de petróleo a 40°C durante 4 h)⁴. Los análisis se realizaron por quintuplicado.

Para el análisis de la calidad de los aceites, se empleó un espectrómetro con transformada de Fourier [Perkin Elmer (modelo spectrum 100 FTIR por sus siglas en inglés)], en la región del infrarrojo medio (400-4000 cm⁻¹). Se tomó 25 µL de cada uno de los aceites y se depositaron en el cristal del equipo para su estudio; a una resolución de 4cm⁻¹. La adquisición y procesamiento de los datos, se realizó usando el software SPECTRUM V5 3.0 y la comparación de ácidos grasos se llevó a cabo usando un estándar con 37 componentes que contenía ácidos grasos saturados, mono- y poli-insaturados (Food Industry FAMES Mix, Restek). Los análisis se realizaron por duplicado.

El diseño del presente estudio fue experimental y analítico. El análisis estadístico para los resultados de infrarrojo fue hecho mediante estadística descriptiva (desviación estándar y promedio).

RESULTADOS

El contenido de aceite en los escamoles crudos y fritos fue de 56 % y 74 % respectivamente. Se identificaron números similares a las investigaciones realizadas por Guillén y Cabo⁵ (Tabla 2 y Figura 1).

Tabla 2. Características de los espectrogramas de los aceites de escamol.

Número	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Modo de vibración
1	723	-(CH ₂) _n -, -HC=CH- (<i>cis</i>)	Flexión (oscilante)
2	914	-HC=CH- (<i>cis</i>)	Flexión fuera del plano
3	968	-HC=CH- (<i>trans</i>)	
4	1033	-C-O	Extensión
5	1097	-C-O	
6	1118	-C-O	
7	1163	-C-O, -CH ₂ -	Extensión o Flexión
8	1238	-C-O, -CH ₂ -	
9	13787	-C-H (CH ₃)	Flexión (simétrico)
10	1417	=C-H (<i>cis</i> -)	Flexión (balanceo)
11	1465	-C-H (CH ₂ , CH ₃)	Flexión (tijeras)
12	1654	-C=C- (<i>cis</i>)	Extensión
13	1700	-C=O (ácido)	Extensión (simétrico)
14	1746	-C=O (éster)	Extensión (asimétrico)
15	2853	-C-H (CH ₂)	
16	2924	-C-H (CH ₂)	
17	2953	-C-H (CH ₃)	Extensión
18	3006	=C-H (<i>cis</i>)	Armónico
19	3468	-C=O (éster)	

Guillén y Cabo⁵

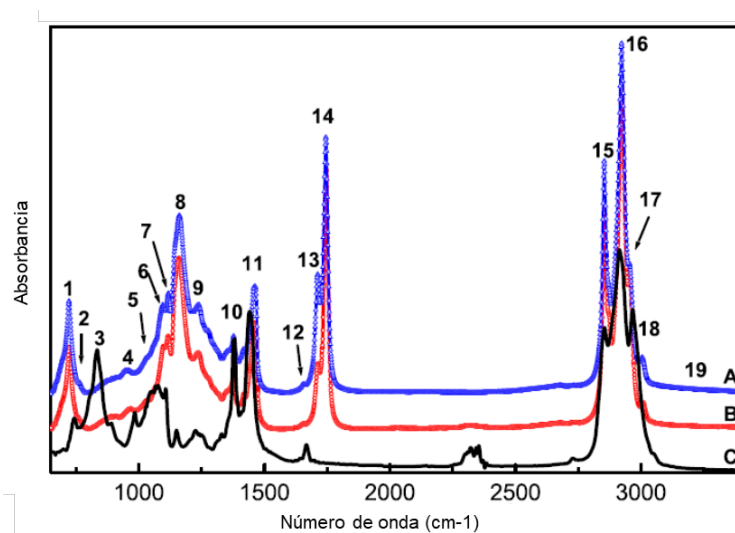


Figura 1. Espectrogramas de los aceites de escamoles extraídos por el método de Soxhlet (éter de petróleo a 40°C durante 4 h), en donde A: Aceite de escamol crudo, B: Aceite de escamol frito y C: estándar.

En las muestras estudiadas no se observó un cambio espectral en los números de onda a 723, 1654 y 3006 cm^{-1} (Figura 1), por lo que los dobles enlaces *cis* que conforman a los ácidos grasos insaturados⁵ son estables; esto se relaciona con una mínima oxidación de los dobles enlaces por el peróxido de hidrógeno^{5,6}. Estos resultados son similares a los reportados por Guillén y Cabo⁵ y Liang et al.⁷ en aceites y grasas y aceite de nuez virgen, respectivamente. En otro estudio relacionado, en un aceite de girasol sometido a termo-oxidación, se observó un incremento y ensanchamiento en la banda de absorción a 3471 cm^{-1} , causado por el aumento de hidroperóxidos^{5,7} que no fue identificada en los aceites de escamol. Por otra parte, a un número de onda a 1749 cm^{-1} no se observó diferencias espectrales de las muestras con respecto al estándar (Figura 1), por lo que los aceites de escamol no presentan ácidos grasos libres⁸, que son compuestos relacionados con el parámetro de calidad en el aceite (índice de acidez)⁹.

CONCLUSIONES

El método de extracción y el freído no afectó a los ácidos grasos insaturados en los aceites de escamol y se observaron cambios mínimos desde el punto de vista nutricional.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. Kaspari, "Introducción a la ecología de las hormigas", En: *Introducción a las hormigas de la región neotropical*, (F. Fernández. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, Colombia. 2003) pp: 97-112.
2. P. Lara, R. Aguirre, P. Castillo, A. Reyes, A. "Biología y aprovechamiento de la hormiga de escamoles, *Liometopum apiculatum* Mayr (Hymenoptera: Formicidae)". *Acta Zoológica Mexicana*. Vol 31, 2, 2015, pp. 251-264.
3. J. Ramos, J. Pino, V. Martínez. "Could Grasshoppers Be a Nutritive Meal" . *Food and Nutrition Sciences*,3, 2012. pp: 164-175.
4. A.O.A.C. Association Official, Analytical Chemists, Food Composition, Natives, Natural Contaminants, Oils and Fats. (A.O.A.C. E.U.A., 1990), pp: 963-967.
5. N. Cabo y M. Guillén, "Relationships between the Composition of Edible Oils and Lard and the Ratio of the Absorbance of Specific Bands of Their Fourier Transform Infrared Spectra. Role of Some Bands of the Fingerprint Region". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 5, 1998. pp: 17888-1793

6. D. Dahlberg, B., S. M. Lee., S. J. Wenger., and J. A. Vargo. "Classification of vegetable oils by FT-IR". *Applied Spectroscopy*. 51, 1997. pp: 1118-1124.
7. P. Liang, Ch. Chen., S. Zhao., F. Ge., D. Liu., B. Liu., Q. Fan., B. Han., and X. Xiong. "Application of Fourier transform infrared spectroscopy for the oxidation and peroxide value evaluation in virgin walnut oil". *Journal of Spectroscopy*. Vol.1, 5. 2013.
8. S. Badui, "Química de los alimentos," (Pearson, México, 2013), pp: 223-272.
9. NMX. Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de acidez. Norma Mexicana NMX-F-101-1987. México.

COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE RIVANOL Y LA PRUEBA DE TARJETA (ROSA DE BENGALA) EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN BOVINOS

Martha Alicia Castañeda Vazquez¹, Erika Patricia Salas Castañeda¹, Hugo Castañeda Vazquez¹, Francisco Javier Padilla Ramírez¹, Carlos Bedolla Cedeño².

¹Laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular. CUCBA, Universidad de Guadalajara.

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

La Brucelosis representa un gran problema de salud pública, considerada una zoonosis importante por ser altamente infecto-contagiosa y de distribución mundial, producida por bacterias del género *Brucella*. El mayor riesgo para la población en general es la ingestión de productos cárnicos y lácteos contaminados y sin pasteurizar. El esquema de diagnóstico de la Brucelosis en México se basa en pruebas serológicas de aglutinación, siendo las más utilizadas en suero sanguíneo la prueba de Tarjeta o Rosa de Bengala (RB) y prueba de precipitación con Rivanol (RIV), ambas detectan anticuerpos formados por la exposición al patógeno desde la segunda o tercera semana posterior a la exposición. El objetivo del estudio fue comparar la eficacia de la prueba de Rivanol y la prueba de Tarjeta como métodos diagnósticos de Brucelosis en ganado bovino. Se muestrearon 93 bovinos (de producción de carne y leche) de 10 ranchos del Estado de Jalisco, obteniendo la sangre por punción coccígea y separación del suero por formación de coagulo y centrifugación. Se siguieron las técnicas para ambas pruebas descritas en la Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional contra la Brucelosis 2003. Se obtuvieron 43 muestras positivas en la prueba de Tarjeta correspondiendo el 46.23% de los casos y 24 positivas con la prueba de Rivanol con títulos de 1:25 a 1:200 de las 43 positivas en la prueba de Tarjeta, que equivale al 55.8% de sensibilidad con Rivanol. Por los valores obtenidos en las dos pruebas éstas permiten su aplicación como pruebas diagnósticas de vigilancia epidemiológica para Brucelosis bovina, pero no como método de diagnóstico definitivo ya que la prueba de Rivanol determina anticuerpos post-vacunales pudiéndose dar falsos positivos al igual que la prueba de tarjeta en casos de revacunaciones recientes, por lo que se sugiere utilizar otros métodos diagnósticos confirmatorios con mayor sensibilidad y especificidad.

INTRODUCCIÓN

La Brucelosis representa un gran problema de salud pública, es una zoonosis considerada dentro de las más importantes por ser una enfermedad altamente infecto-contagiosa. Es de distribución mundial y producida por bacterias del género *Brucella* (Mandell et al., 1995; Sauret y Vilissova, 2002; Sbriglio et al., 2007; Mejía y Lemus, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) elaboró un manual de bioseguridad para los laboratorios en donde clasifica a los microorganismos del género *Brucella* en el Grupo de Riesgo III. La brucelosis se transmite fácilmente a las personas, las Bruselas son excretadas en la leche por lo que el humano puede adquirir la enfermedad al consumir leche infectada sin pasteurizar y subproductos lácteos como queso fresco, helados, mantequilla, etc., elaborados con leche no pasteurizada. También se adquiere a través de abrasiones o cortaduras en la piel, por salpicaduras en la conjuntiva, aerosoles formados en algún proceso, transfusiones de sangre o trasplante de tejidos, y por auto-inoculación accidental durante la vacunación y toma de muestras.

Debido al alto riesgo de contagio, la brucelosis es considerada como una enfermedad ocupacional entre vaqueros, veterinarios, ganaderos, matanceros y técnicos de laboratorio. Causa una enfermedad febril aguda llamada fiebre ondulante o fiebre de Malta entre otros sinónimos, puede convertirse en crónica llegando a originar graves complicaciones afectando a los músculos esqueléticos, sistema cardiovascular y sistema nervioso central. Por lo que es enfermedad de reporte obligatorio en los animales de producción y de compañía (OIE, 2004; Herrera-López et al., 2007).

La mayor incidencia de Brucelosis en México se encuentra en el suroeste del país, seguida en frecuencia en el centro y en menor proporción en el norte del país (López M. et al., 1992).

En el ganado bovino el agente causal de la Brucelosis es principalmente *Brucella abortus* y con cierta frecuencia *Brucella melitensis*, ésta última considerada la de mayor contagiosidad para el humano, afecta también a cabras, ovejas, alpacas y ocasionalmente a los cerdos (Rodríguez T. et al., 2001).

En animales infectados por *Brucella abortus* o por *Brucella melitensis*, las hembras gestantes desarrollan una inflamación en la placenta que llega a ocasionarles aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación, excretándose una gran cantidad de microorganismos a través de la placenta, los líquidos fetales y exudados vaginales, en éstos últimos aún sin darse el aborto.

Llega a producirse diseminación bacteriana a los ganglios linfáticos regionales y glándula mamaria pudiendo los microorganismos excretarse en la leche (Wolter y Castañeda, 2004).

Causa grandes pérdidas económicas por disminución en la producción de leche o de carne del rebaño, aumento del lapso interparto, menor producción de terneros por los abortos, infertilidad en hembras y machos y por gran cantidad de reemplazos (Rodríguez et al., 2001).

Brucella abortus, *B. melitensis* y *B. suis* son altamente patógenos para el humano por lo que todos los tejidos infectados, cultivos y el material potencialmente contaminado deben manejarse bajo condiciones apropiadas de contención.

El diagnóstico de los animales infectados por *Brucella* se realiza mediante el aislamiento e identificación de la bacteria, así como por métodos serológicos o moleculares cuando no es posible el análisis bacteriológico. Habitualmente se recomienda una combinación de los métodos serológicos, bacteriológicos y/o moleculares (Manual OIE, 2008).

Pruebas serológicas

Ninguna prueba serológica aislada es adecuada, se deben considerar todos los factores que influyen en el método de prueba y de sus resultados para una aplicación o interpretación diagnóstica específica (Manual OIE, 2008).

Actualmente, el esquema de diagnóstico de la brucelosis en México, se basa en pruebas serológicas que determinan la presencia de anticuerpos mediante pruebas de aglutinación (Norma Oficial Mexicana 2003). Las más utilizadas en suero sanguíneo son: Prueba de tarjeta o Rosa de Bengala (RB), que detecta anticuerpos IgG1 e IgM contra cepas lisas de *Brucella*; puede ser realizada como prueba tamiz en bovinos, caprinos y porcinos además de ser un procedimiento cualitativo y rápido. Prueba de precipitación con Rivanol (RIV), que detecta anticuerpos específicos IgM y otras macroglobulinas contra cepas lisas de *Brucella*, se recomienda realizarla para efectos de campaña en sueros de bovinos que previamente resultaron positivos a la prueba de tarjeta; con el fin de diferenciar una respuesta postvacunal de una infecciosa por lo que se considera una prueba complementaria cuantitativa (Norma Oficial Mexicana 2003; Bouza et al., 2005; Mejía y Lemus, 2012). Dichas pruebas detectan anticuerpos formados por la exposición al patógeno desde la segunda o tercera semana posterior a la exposición.

La prueba de fijación de complemento (FC) que es una prueba confirmatoria y de referencia internacional, determina títulos de anticuerpos fijadores del complemento contra cepas lisas de *Brucella spp.* en sueros de bovinos, caprinos, ovinos u otras especies, al igual que la prueba de ELISA competitiva (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) sugiere su uso por considerarlas pruebas sensibles y específicas que logran diferenciar anticuerpos vacunales y anticuerpos infecciosos (Norma Oficial Mexicana 2003; OIE, 2004; Bouza et al., 2005; Mejía y Lemus, 2012).

Las pruebas diagnósticas oficiales se aplican de la siguiente forma:

En bovinos: En hembras mayores de 22 meses de edad que recibieron la dosis clásica de vacuna cepa 19 entre los 3 y 6 meses de edad; en hembras vacunadas con dosis reducida, únicamente se podrán realizar las pruebas diagnósticas 10 meses después de la fecha de vacunación; en las hembras nunca antes vacunadas y en los machos enteros, el muestreo se debe realizar a partir de los 6 meses de edad.

Prueba de Rosa de Bengala (RB) o Prueba de Tarjeta.

Esta es una prueba sencilla y rápida de aglutinación que utiliza antígeno coloreado con rosa de bengala y tamponado a pH bajo, normalmente $3,65 \pm 0,05$ (Mejía y Lemus, 2012). Los antígenos para diagnóstico en esta prueba utiliza la cepa 99 de *B. abortus* (Weybridge) (S99) o la cepa 1119-3 (USDA) (S-1119-3).

Ésta prueba es ampliamente utilizada en campañas de control y erradicación de la Brucelosis en varios países. Aunque hay que tomar en consideración los falsos positivos en relación a algunos animales vacunados con la cepa 19, por lo que se recomiendan las pruebas confirmatorias FC o ELISA competitiva (Acosta y Ortiz, 2005).

Prueba de Rivanol

Es de tipo cuantitativa y cualitativa; consiste en confrontar el suero problema con un colorante de acridina que precipita las inmunoglobulinas de la muestra, principalmente las IgM, quedando en solución solo las IgG, que son las directamente involucradas con la respuesta inmune ante una cepa de campo.

En bovinos la prueba de rivanol ayuda a confirmar el diagnóstico, lo que permite la diferenciación entre los animales vacunados y los infectados. Para realizar la prueba en animales vacunados con la cepa S19 se requiere que haya transcurrido de 10-12 meses después de la aplicación del biológico, mientras que en animales vacunados con la cepa RB51 esta diferenciación se puede realizar en cualquier momento.

La NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales establece:

- La prueba de Rivanol se debe realizar sólo en suero de bovino.
- Con sueros no hemolizados, positivos a la prueba de tarjeta.
- Con antígeno autorizado por la Secretaría y con reactivo de rivanol (lactato de 2 etoxi 6,9 diamino acridina).
- El antígeno debe ser elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* y debe reunir las siguientes características:
 - a) Teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta
 - b) pH 5.8 a 6.2
 - c) Concentración celular 4%

Los resultados se clasificarán en sueros positivos y negativos. Se consideran positivos, todos aquellos sueros de animales no vacunados que presenten reacción de aglutinación completa en cualquiera de las diluciones, desde 1/25 a 1/400. En el caso de ganado vacunado, la aglutinación completa en una dilución mayor o igual a 1/50 será una prueba positiva.

PARTE EXPERIMENTAL

El objetivo del estudio fue comparar la eficacia de la prueba de Rivanol y la prueba de Tarjeta como métodos diagnósticos de Brucelosis en ganado bovino.

Se muestrearon 93 bovinos de producción de carne y leche de 5 ranchos en el Estado de Jalisco, se obtuvo la sangre por punción coccígea en tubos de ensayo sin anticoagulante, separando el suero por formación de coágulo y centrifugación a 2000 rpm/5-10min y colocados en tubos eppendorf.



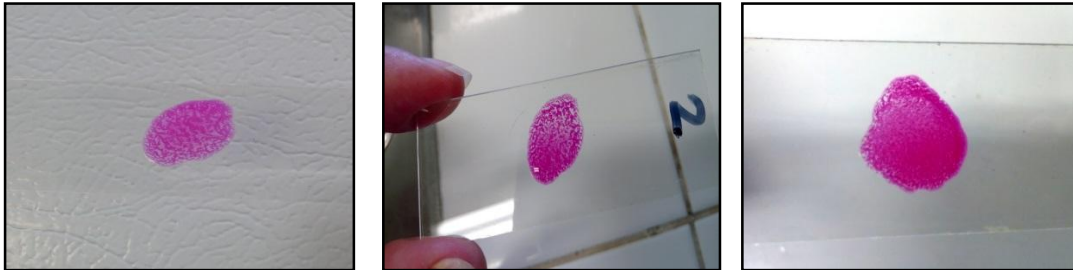
Para la prueba de Tarjeta previa verificación de la prueba con un suero control, en portaobjetos individuales se depositaron 30µl de los sueros sanguíneos y 30µl del reactivo de Rosa de Bengala (*B. abortus* cepa 1119-3 al 8%) ambos a temperatura ambiente, mezclándolos en una zona circular de aproximadamente 2cm de diámetro con aplicadores de madera estéril y posterior agitación de las laminillas con movimientos rotatorios manuales por 4 minutos (NOM-2003) procediendo inmediatamente después de los 4 minutos de agitación a la lectura de las laminillas sobre fondo blanco mediante la observación directa de presencia de grumos de aglutinación pequeños o grandes (positiva) o la ausencia de los mismos (negativa).



La prueba de Rivanol se realizó únicamente a los sueros positivos de la prueba de Tarjeta (24 muestras), llevando a cabo diluciones 1:25 a 1:400 según lo marca la NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

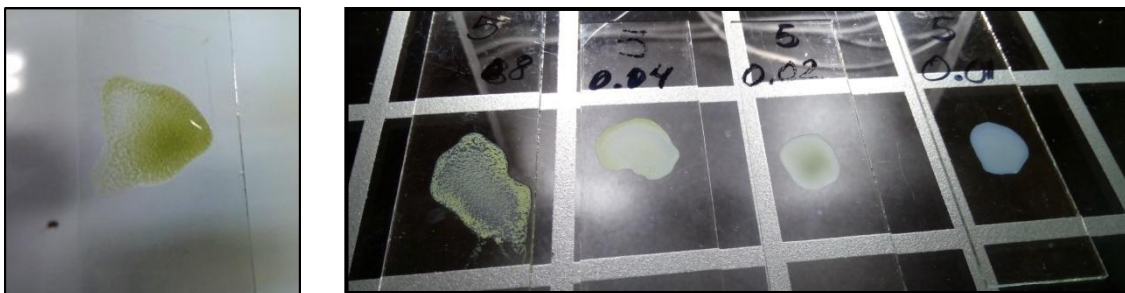
RESULTADOS

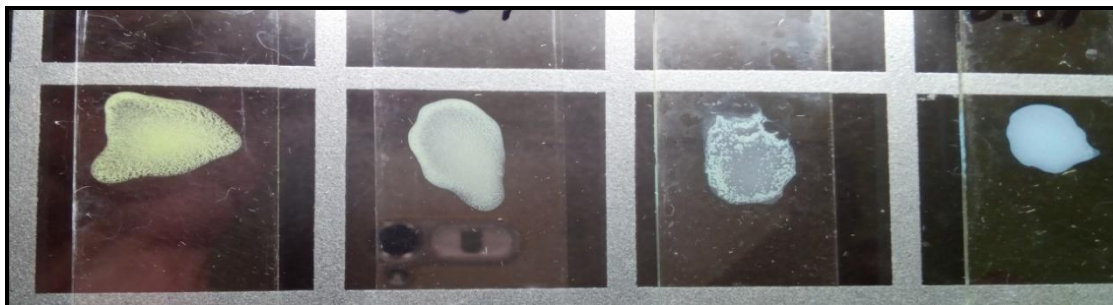
De los 93 sueros procesados se obtuvieron 43 muestras positivas con aglutinación visible en la prueba de Tarjeta lo que corresponde al 46.23% del total de las muestras.



Con la prueba de Rivanol los resultados se clasificaron en sueros positivos y negativos. Considerando positivos, todos aquellos sueros de animales no vacunados que presenten reacción de aglutinación completa en cualquiera de las diluciones, desde 1/25 a 1/400. Y en el caso de ganado vacunado, la aglutinación completa en una dilución mayor o igual a 1/50 se consideró positiva.

En la prueba de Rivanol se obtuvieron 24 muestras positivas con títulos de 1:25 a 1:200 de las 43 positivas en la prueba de Tarjeta, que equivale al 55.8% de sensibilidad con Rivanol.





CONCLUSIÓN

Estas pruebas son un procedimiento cualitativo de ejecución rápida de macro aglutinación, lo cual permite su aplicación como prueba diagnóstica y de vigilancia epidemiológica de rebaños infectados o para garantizar la ausencia de infección en rebaños libres de brucelosis ya que se reporta la sensibilidad del 94% y especificidad del 100%, muy cercano a los valores de la prueba confirmatoria ELISA Competitiva del 99.7% de sensibilidad y 100% de especificidad.

Sin embargo, como toda prueba serológica, a veces origina una reacción positiva debido a títulos altos de residuos vacunales, incrementándose en bovinos revacunados (Aparicio-Bahena et al., 2003) o a reacciones serológicas positivas falsas.

Por lo cual se sugiere que las reacciones positivas deban confirmarse con otros métodos serológicos como Fijación de Complemento, ELISA indirecta y la prueba de la polarización de fluorescencia cuando el aislamiento y la identificación bacteriológica de *Brucella* no sea posible.

Las reacciones negativas falsas se producen muy raramente. Por los valores obtenidos en las dos pruebas éstas permiten su aplicación como pruebas diagnósticas de vigilancia epidemiológica para Brucelosis bovina, pero no como método de diagnóstico definitivo ya que la prueba de Rivanol determina anticuerpos post-vacunales pudiéndose dar falsos positivos al igual que la prueba de tarjeta en casos de revacunaciones recientes, por lo que se sugiere utilizar otros métodos diagnósticos confirmatorios con mayor sensibilidad y especificidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta A. Miguel, Ortiz Martín, Brucelosis Caprina. Laboratorio de Bacteriología, Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal-Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Revista de Ciencias Veterinarias. Vol. 21, 2, 2005. Lima Perú.
2. Aparicio Bahena A., Díaz Aparicio E., Hernández Andrade L., Pérez González R., Alfonseca Silva E., Suárez Güemes F., Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. Téc Pecu Méx, Vol. 41, 2, 2003, pp 129 -140.
3. Bouza E., Sánchez Carrillo C., Hernán Gómez S., González M.J., Laboratory-acquired brucellosis: A Spanish national survey. J.Hosp Infect 2005; 61, pp 80 – 83.
4. Herrera Lopez E., Hernández Andrade L., Palomares Reséndiz G., Díaz Aparicio E., Study of brucellosis incidence in a bovine dairy farm infected with *Brucella abortus*, where cattle was revaccinated with RB51. International Journal of Dairy Science, Vol.2,1,2007, pp 50-57
5. López Merino A., Migranas Ortiz R., et al., Sero epidemiología de la Brucelosis en México. Salud Pública Mex., Vol.34, 2, 1992, pp 230 - 240.
6. Mandell G.J., Bennet R. D., Principles and practice of infectious diseases. (4th ed. Churchill Livingstone. Philadelphia, USA. Meador V, B Deyoe. 1995) Chapter 2, pp 2053-2057.
7. Manual OIE sobre animales terrestres, Cap.2.4.3, 2008, pp 268-719.
8. Mejía Martínez K., Lemus Flores C., Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con ELISA para el diagnóstico de brucelosis bovina. REDVET, Vol.13, 2, 2012.
9. Moreno Rosales, et al., Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California, Tec Pecu Mex, Vol. 40, 3, 2002, pp 243 - 249.

10. Norma Oficial Mexicana, Nom-056-Zoo-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria SAGARPA. 2003.
11. OIE. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines. Bovine brucellosis. Paris, 2004.
12. Rodríguez A., Orduña A., Ariza X., Moriyon I., Díaz R., Blasco J., Manual de Brucelosis. Ed. Junta de Castilla y León. Copyright. Zamora, España. 2001.
13. Samartino L., Schust M., Piazza E., Salustio E., Conde S., Diagnóstico de la brucelosis animal: implementación de nuevas tecnologías, XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco, Perú, Arch. Latinoam. Prod. Anim., Vol. 15, 1, 2007, pp19 – 22.
14. Sauret J., Vilissova N., Human Brucellosis, J. Am Board Fam Pract., Vol. 15, 2002, pp 401-406.
15. Wolter W., Castañeda V. H., Kloppert B. y Zschöck M., Mastitis Bovina, Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. Editorial Universitaria. Primera Edición. Guadalajara, Jalisco, México, 2004.

EFECTO DEL DIGESTATO Y LA FRECUENCIA DE DEFOLIACIÓN EN LOS COMPONENTES DEL RENDIMIENTO DE FORRAJE DE BALLICO PERENNE (*LOLIUM PERENNE* L.) BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.

María Myrna Solís Oba, Karim Hassam Montalvo Aguilar, Laura Jeannette García Barrera, Rigoberto Castro Rivera.

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Ex-hacienda de San Juan Molino, carretera Tecuexcomac - Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala, México

RESUMEN

Conocer el efecto del digestato que es el subproducto de digestión anaeróbica de los residuos sólidos del ganado, en el rendimiento de los pastos es una justificación para reducir el uso de agroquímicos. El objetivo fue evaluar el efecto de la concentración, la frecuencia de cosecha y la frecuencia de riego sobre los componentes del rendimiento de Ballico perenne. Para ello, se evaluaron las concentraciones de digestato (20, 40 y 60%), las frecuencias de cosecha (4, 5 y 6 semanas) y las frecuencias de riego (15 y 30 días). Las variables fueron: materia seca, peso de las hojas, tallos, altura de la planta, tasa de crecimiento del cultivo. El digestato fue adquirido en la Universidad de Chapingo. Se utilizó un diseño factorial con arreglo $3 \times 3 \times 2$, y las comparaciones de medias fueron hechas por Tukey ($P < 0.05$), mediante el procedimiento GLM del software SAS. Los resultados mostraron que el mayor rendimiento (4.25 y 6.67 g MS kg^{-1} suelo), peso de hojas, tallos, tasa de crecimiento del cultivo y altura de la planta fue con el tratamiento del 60% del digestato, la frecuencia de cosecha cada cinco semanas en verano y seis semanas en otoño (4.32 y 7.1 g MS kg^{-1} suelo) y el riego cada 15 días ($P < 0.01$). Se concluye que la concentración, las frecuencias de cosecha y las frecuencias de riego de digestato afectan el rendimiento y pueden utilizarse como sustitutos de fertilizantes agroquímicos.

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento adecuado de praderas, requiere del conocimiento del manejo agronómico, distribución estacional del rendimiento y la respuesta a las frecuencias de defoliación. Sin embargo, el rendimiento de los forrajes está sujeto a un patrón de crecimiento, influenciado por la temperatura, humedad y nutrientes del suelo que determinan la cantidad de biomasa por ciclo de producción (Castro *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2016).

El costo económico y ambiental de los fertilizantes inorgánicos es elevado, debido a los altos costos en el proceso de producción y en la contaminación de suelos y agua. La utilización de residuos sólidos orgánicos de origen animal, puede reducir el uso de fertilizantes químicos; sin embargo, también hay contaminación de suelos y aguas por la acumulación de nitratos (NH_3) y fosfatos (PO_4^{3-}), por el almacenamiento o acumulación de las excretas (Walsh *et al.*, 2012). Por lo que se debe tener cuidados en la utilización de los mismos.

La digestión anaeróbica de los residuos sólidos del ganado, permite maximizar el retorno de nutrientes al suelo, y reducir la dependencia de fertilizantes químicos. Al respecto Walsh *et al.* (2012) reportaron que, en praderas de ballico perenne, el digestato registró rendimientos superiores ($P < 0.05$), a praderas mixtas con trébol blanco y a los fertilizantes con N y NPK, donde éstos no registraron diferencias ($P > 0.05$) a praderas no fertilizadas. Tampere y Viiralt (2014), reportaron que usar digestato en la fertilización incrementó en promedio 2.41 t MS ha^{-1} , en comparación con praderas de clima templado que no se fertilizaron; así mismo, no se registró diferencias ($P > 0.05$) con la fertilización química la cual fue superada con 1.3 t MS ha^{-1} , y concluyen que usar los digestatos pueden ser usado como sustitutos de los fertilizantes químicos.

Rancane *et al.* (2015), mencionan que los digestatos tiene efectos diferentes en cada especie de pasto, y por lo tanto conocer cómo se comportan las especies a este tipo de fertilización es importante para un manejo del rendimiento; así mismo, permite un aprovechamiento integral de ese recurso renovable, que no necesita más que darle manejo para que se conserve y persista en el lugar (Rancane *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior y considerando que el uso de digestatos puede ser considerado como una práctica del reciclaje de nutrientes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de fertilización con digestatos a diferentes concentraciones y frecuencias de aplicación y de la

frecuencia de defoliación en los componentes del rendimiento de ballico perenne en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en un invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, ubicado a 19°16'50.3" N, 98°21'58.1" O, a 2221 msnm.

La siembra de ballico perenne fue colocando 15 semillas en bolsas de plástico de 1.5 kg (unidad experimental), al emerger las plántulas se aseguró que solo estuvieran 10 tallos, posteriormente a los 70 días después de la siembra, se realizó un corte de uniformización a cinco cm de altura, para reducir el efecto de covariable. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 X 3 X 2; los tratamientos fueron concentración de digestato (20, 40 y 60%), frecuencia de defoliación (4, 5 y 6 semanas), frecuencia de aplicación (15 y 30 días), más dos testigos, un control positivo (fertilización con triple 17) y el control negativo (suelo sin fertilización).

Las semillas fueron donadas por el Laboratorio de Forrajes del Posgrado en Ganadería del Colegio de Postgraduados y el digestato líquido se obtuvo de la Granja Experimental del Departamento de Zootecnia de la Universidad de Chapingo y el suelo utilizado como sustrato se obtuvo de la parcela experimental de CIBA IPN Unidad Tlaxcala.

Se hicieron análisis metagenómicos del digestato y del suelo, a los que se extrajo el ADN total, utilizando el PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen Mo Bio). Se analizó el gen 16S rARN, región V4 y la región ITS1-2 para el análisis de diversificación bacteriana y fúngica respectivamente. La secuenciación masiva se realizó en MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA) en un equipo PGM Ion Torrent.

El rendimiento de biomasa se midió por maceta, en el cual, se cortó todo el forraje a una altura de cinco cm, el material vegetal cosechado se lavó y se pesó en fresco, posteriormente se secó en una estufa de aire forzado a 70 °C, por 48 horas.

Se registró la altura de forraje antes de cada corte con una regla graduada de cincuenta centímetros y una precisión de 0.1 cm, en cada repetición de cada tratamiento, en plantas elegidas al azar, con la regla colocada completamente vertical desde la base de la planta hasta la hoja superior más joven (Castillo *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2011).

La tasa de crecimiento (TC) se calculó con los datos de rendimiento de materia seca por corte mediante la siguiente fórmula:

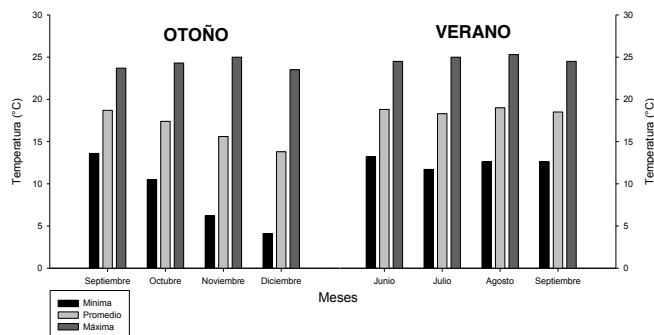
$$TC = \frac{FC}{t}$$

Donde FC = forraje cosechado (g MV maceta), y t = días transcurridos entre un corte y el siguiente. La relación hoja: tallo se obtuvo dividiendo el rendimiento por corte del componente morfológico hoja entre el rendimiento por corte del tallo.

El forraje cosechado se separó en los componentes morfológicos: hoja, tallo, inflorescencia y material muerto. Cada componente se pesó en fresco, posteriormente se secó en una estufa de aire forzado a 70 °C, por 48 horas.

Los valores agrupados por época se graficaron mediante el software estadístico SigmaPlot V.10 y se analizó con el procedimiento factorial ANOVA y PROC GLM del Software estadístico SAS® Versión 9.0 para Windows®. Las medias de tratamientos fueron estimadas utilizando Tukey a un nivel de significancia del 5%.

Figura 1 Temperatura promedio, máxima y mínima, durante el desarrollo del experimento en Tepetitla de Lardízabal, Tlaxcala (<https://www.accuweather.com/es/mx/tepetitla/240244/march-weather/240244>).



RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados derivados del análisis de factorial sugieren que, en la época de verano (Cuadro 1) y otoño (Cuadro 2), el mayor rendimiento de forraje ($P < 0.01$) se dio a la concentración del 60% (D60) del digestato (4.7 y 6.7 g MS maceta, respectivamente), superando en promedio en 20 y 70% a la concentración de 40 y 20%, (D40 y D20, respectivamente) en ambas épocas, la frecuencia de riego de 15 días (FR15) fue superior en 40% a regar cada 30 días (FR30) y la frecuencia de defoliación cada 5 semanas (FD5) en verano fue 14 y 65% superior a las de 4 y 6 semanas, (FD4 y FD6, respectivamente), mientras que en otoño la FD6 fue 74 y 40% a las FD4 y FD5, respectivamente (Cuadro 2). En términos generales el rendimiento de forraje fue mayor en la época de otoño con respecto al verano, las C superaron en 40, 46 y 38% (60, 40 y 20%, respectivamente), las FR en 38 y 46% (15 y 30 días, respectivamente) y las FD en 1, 9 y 156% (4, 5 y 6 semanas).

El comportamiento por tratamiento en el rendimiento muestra un incremento gradual y positivo conforme incrementa el porcentaje de digestato y lo mismo ocurre con la frecuencia de riego, siendo el tratamiento 60%15d el que mostró los valores más altos tanto en verano como otoño (Figura 2A y 2B); sin embargo, el control positivo a FD6, registró el valor más alto en otoño de todos los tratamientos, mientras que a la FD4 fue el más bajo, siendo superado por el suelo sin fertilizar (Figura 2A).

Cuadro 1. Variables evaluadas en Ballico perenne, a diferentes concentraciones de digestato, frecuencias de corte y frecuencia de aplicación en la época de verano.

Factor	Materia seca (g MS maceta)	Peso Hoja (g MS maceta)	Peso Tallo (g MS maceta)	Altura	TCC (g MS maceta d ⁻¹)	RHT	Proteína (g P*g Hoja)
Concentración de biol							
60	4.76 A	3.76 A	0.45 A	44.17 A	0.14 A	8.81 B	0.73 A
40	3.84 B	3.11 B	0.32 B	41.94 B	0.11 B	9.83 B	0.60 B
20	2.81 C	2.47 C	0.21 C	40.05 C	0.08 C	16.11 A	0.43 C
Frecuencia de aplicación							
15 días	4.50 A	3.69 A	0.41 A	43.56 A	0.13 A	9.59 B	0.70 A
30 días	3.11 B	2.53 B	0.24 B	40.55 B	0.09 B	13.61 A	0.48 B
Frecuencia de defoliación							
4 semanas	4.01 B	3.59 A	0.33 A	39.87 B	0.14 A	11.87 AB	0.83 A
5 semanas	4.61 A	3.78 A	0.38 A	40.62 B	0.13 A	14.02 A	0.60 B
6 semanas	2.79 C	1.97 B	0.26 B	45.67 A	0.06 B	8.87 B	0.34 C
Factores							
Aplicación	**	**	**	**	**	**	**
Concentración	**	**	**	**	**	**	**
Defoliación	**	**	**	**	**	**	**
C*A	**	**	**	**	**	**	**
D*A	*	NS	NS	**	NS	*	NS
D*C	**	**	*	**	**	**	**
D*C*A	**	**	NS	**	**	**	**

Diferentes literales en columnas son estadísticamente diferentes, (P < 0.01 **)

La tasa de crecimiento, presentó un comportamiento similar al rendimiento, tanto en verano como en otoño; sin embargo, en esta última época la FD6 fue superior a las FD4 y FD5, mientras que en verano se registró un comportamiento inverso.

Para el componente hoja en la época de verano (Cuadro 1), la C60 (3.76 g MS maceta) superó 20 y 52% a la de C40 y C20, respectivamente; y la FR15 fue superior en 45% a FR30, y la FD5 superó en 5 y 91% a la FD4 y FD6 (Cuadro 1). En otoño en C60 (5.5 g MS maceta) superó 16 y 61% a C40 y C20, respectivamente; y la FR15 fue superior en 32% a FR30, y la FD6 superó en 59 y 35% a la FD4 y FD5 (Cuadro 2).

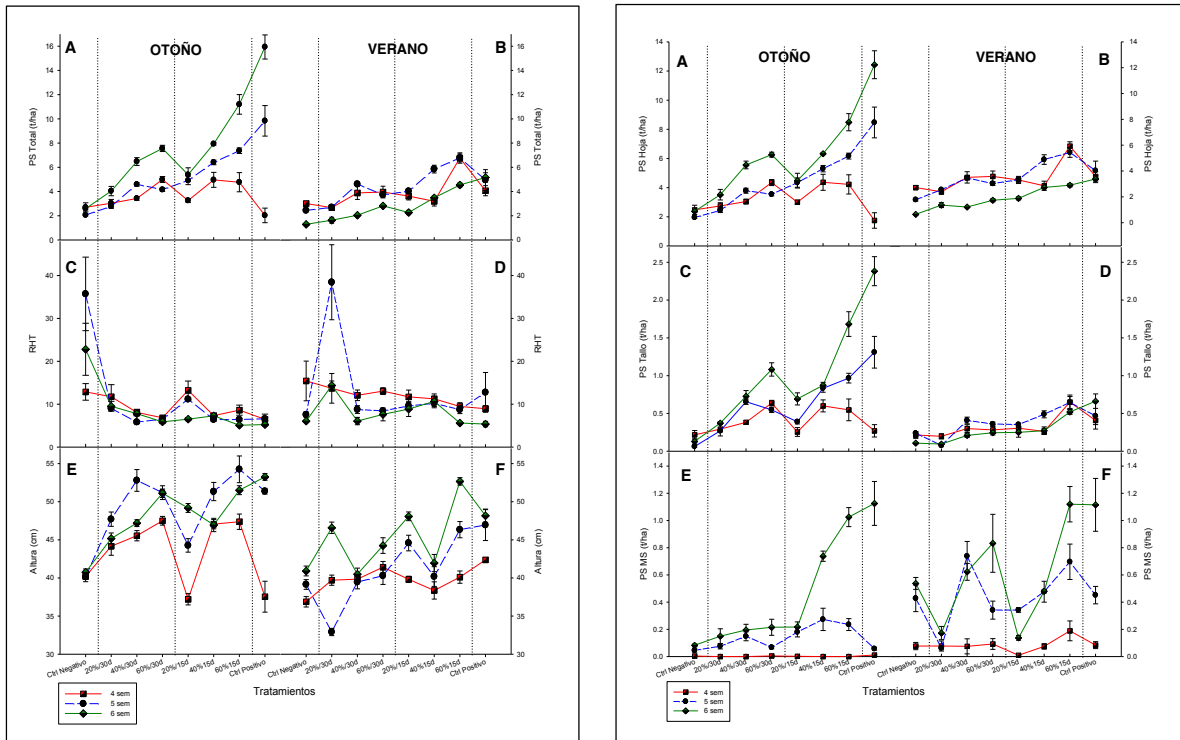
Cuadro 2. Variables evaluadas en Ballico perenne, a diferentes concentraciones de digestato, frecuencias de corte y frecuencia de aplicación en la época de otoño.

Factor	Materia seca (g MS maceta)	Peso Hoja (g MS maceta)	Peso Tallo (g MS maceta)	Altura	TCC (g MS maceta d ⁻¹)	RHT	Proteína (g P*g Hoja)
Concentración de biol							
60	6.67 A	5.50 A	0.91 A	50.48 A	0.18 A	6.56 B	1.03 A
40	5.63 B	4.72 B	0.67 B	48.47 B	0.15 B	7.12 B	0.86 B
20	3.90 C	3.41 C	0.37 C	44.61 C	0.11 C	10.19 A	0.54 C
Frecuencia de aplicación							
15 días	6.24 A	5.18 A	0.76 A	47.68 A	0.17 A	8.00 A	0.93 A
30 días	4.56 B	3.91 B	0.55 B	48.04 A	0.12 B	7.91 A	0.69 B
Frecuencia de defoliación							
4 semanas	4.07 C	3.62 C	0.45 C	44.80 C	0.14 B	9.30 A	0.79 A
5 semanas	5.03 B	4.26 B	0.61 B	50.25 A	0.14 B	7.56 B	0.78 A
6 semanas	7.09 A	5.77 A	0.90 A	48.51 B	0.16 A	7.01 B	0.85 A
Factores							
Aplicación	**	**	**	NS	**	NS	**
Concentración	**	**	**	**	**	**	**
Defoliación	**	**	**	**	**	**	NS
C*A	NS	NS	NS	*	NS	NS	**
D*A	**	**	**	*	**	NS	NS
D*C	**	**	**	**	**	*	NS
D*C*A	**	*	*	**	*	NS	NS

Diferentes literales en columnas son estadísticamente diferentes, (P < 0.01 **)

La producción de tallo en verano (Cuadro 1) registró (P < 0.01) que C60 (0.45 g MS maceta) superó en 40 y 114% a la C40 y C20, respectivamente; mientras que FR15 registró tallos 70% más pesados que FR30 y la FD5 superó en 15 y 46% la FD4 y FD6, respectivamente. En otoño C60 (0.91 g MS maceta) superó en 35 y 145% a C40 y C20 (P < 0.01), respectivamente; mientras que en la FR15 los tallos fueron 38% más pesados que la FR30 y la FD6 superó en 47 y 100% la FD5 y FD4, respectivamente (Cuadro 2). En el análisis de los tratamientos se observa que en otoño se produjo mayor cantidad de hoja y tallo que en verano, y la FD6 (P < 0.05) registró el mayor cambio en estos componentes, mientras que la FD4 del control positivo en otoño, registró el valor más bajo de todos los tratamientos y en las dos épocas (Figura 3A, 3B, 4A y 4B).

Figura 2. Derecha (rendimiento de materia seca, relación hoja: tallo y altura de la planta) y Figura 3. izquierda (hoja, tallo, material senescente), de Ballico perenne a diferentes concentraciones de digestato, en suelo solo y fertilizante químico (17-17-).



La altura de la planta en verano (Cuadro 1) muestra que la C60 (44.2 cm) fue ($P<0.01$) superior en 5 y 10% a la C40 y C20; mientras que la diferencia de la FR fue de solo el 7% y la FD6 fue superior en 13% en promedio a las otras FD. En otoño (Cuadro 2) la C60 (50.5 cm) fue ($P<0.01$) superior en 4 y 13% a la C40 y C20; mientras que en las FR no se registraron diferencias ($P>0.05$) y la FD5 solo superó en 3 y 12% a las otras FD. En los tratamientos 20%15d, el control positivo de la FD4 y 60%15d de la FD5, la altura del pasto en verano fue superior al otoño, mientras que en todos los demás tratamientos no se presentó este efecto (Figura 2E y 2F).

La relación hoja:tallo que está estrechamente correlacionada con el valor nutritivo del forraje, tomando como referencia que valores superiores a 1 son parámetros de buena calidad, los resultados obtenidos muestran que en todos los tratamientos en verano (Cuadro 1) superaron valores de 9, y la C20 (16.1), la FR30 (13.61) y la FD5 (14), fueron los que registraron los valores más altos ($P<0.01$). Mientras que en el otoño la C20 (10.19) superó en 43 y 55% a la C40 y C60, respectivamente; y las FR no mostraron diferencias ($P>0.05$) y finalmente la FD4 (9.3), fue superior en 24 y 32% a la FD5 y FD6 (Cuadro 2). En los tratamientos se puede observar que, en la FD5 en verano, tuvo una tendencia descendente conforme se incrementa la concentración del digestato y la frecuencia de riego del mismo (Figura 2D), mientras que el otoño este mismo efecto se presentó en la FD de 6 semanas (Figura 2C).

Los resultados observados en el presente trabajo, respaldan lo expuesto por Rancane *et al.* (2015) y Wash (2012), quienes observaron un incremento en el rendimiento del forraje con la adición de digestato; Sin embargo, estos autores solo exponen las diferencias en el rendimiento total, y no describen los componentes del rendimiento, que son más útiles para un programa de manejo, con la finalidad de producir forraje de mayor valor nutritivo.

Así mismo, este trabajo no coincide con lo reportado por Tampere y Viral (2014), quienes exponen que la diferencia entre el digestato y el fertilizante químico es de 53%, mientras que en este trabajo solo fue del 35% en el verano, y en el otoño se presentó el efecto inverso, pero esto puede ser porque estos autores reportaron el rendimiento acumulado de un año, y en este trabajo solo se

reportan dos épocas, por lo que se debe continuar con la evaluación del efecto de los digestatos en el rendimiento acumulado en las 4 épocas del año; así mismo, no evaluaron frecuencias de corte y solo midieron el rendimiento en la pradera en general.

Chávez et al. (2006) menciona que para el Ballico perene, la madurez del forraje tiene efecto sobre la digestibilidad y el bienestar de los animales, esto debido a los cambios en la morfología de la planta (proporción de hojas, tallos e inflorescencia) y los componentes celulares, que a la vez afectan el consumo de materia seca. Estos cambios son el incremento de fibra en el tallo y se reduce el N en la hoja, es por ello que al madurar la planta, la fibra incrementa y se reduce la proporción de proteína en el pasto, lo que conlleva a una menor digestión e ineficiencia en el aporte de los pastos a la producción animal.

Con respecto a las frecuencias de defoliación, los resultados obtenidos son similares a los reportados en Ballico perenne por Velasco et al. (2002; 2007); Rojas et al. (2016) y Garduño et al. (2009); es decir, conforme avanza la edad de rebrote el rendimiento incrementa, así como los componentes del mismo y en las semanas 4 y 5 de rebrote es cuando se da la mayor proporción de hoja como se obtuvo en este experimento en el verano y en el otoño; sin embargo, difieren en la época del año, ya que en éste estudio el otoño presentó mayor rendimiento que en verano, esto puede deberse a que el experimento fue en invernadero y el de Velasco et al. (2002; 2007) y Garduño et al. (2009) fue a cielo abierto.

Schlegel et al. (2016) Mencionan que la concentración de minerales en el suelo está en función de la composición botánica, etapa de crecimiento y frecuencia de corte; así mismo, la proporción de ciertos minerales como P, Cu y Zn, está influenciado por procesos microbianos y derivado del análisis metagenómico, se identificaron 293 microorganismos presentes en el suelo, mientras que el digestato aportó 410, de los cuales los géneros *Bacillus*, *Frankia*, *Sinorhizonium*, *Rhizobium*, *Paenibacillus*, *Variovorax*, *Lysobacter*, *Azospirillum*, *Streptomyces* son reportados como bacterias de interés agrícola al ser fijadoras de nitrógeno e inhibidoras de fitopatógenos, los cuales son recomendados para mejorar las condiciones de las plantas al intervenir por diferentes mecanismos bioquímicos y mejorar los aspectos morfofisiológicos y de la raíz, principalmente (Gaggia et al., 2013), como paso en este experimento.

CONCLUSIONES

Los factores que intervienen en el rendimiento de forraje y sus componentes, es la concentración del digestato, la frecuencia de riego y la frecuencia de defoliación, así como la interacción entre estos factores.

La época de otoño superó en todas las variables evaluadas a los obtenidos en la época de verano, por lo que se debe continuar con la toma y análisis de los datos de las épocas de invierno y primavera. Así mismo, se debe continuar con la evaluación del efecto a largo plazo del uso de digestatos y evaluar otros parámetros como la fertilidad de los sustratos, y la riqueza y abundancia de microorganismos.

Los microorganismos y minerales presentes en el digestato, están determinando el incremento en los componentes del rendimiento, ya que conforme se incrementa la frecuencia de riego y la concentración los resultados son positivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad J., Iqbal A., Ayub M., Akhtar J. 2016. Forage yield potential and quality attributes of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Under various agro-management techniques. *The Journal of Animal & Plant Science*. 26 (2): 465-474.
2. Castillo EG, Valles MB, Jarillo RJ. Relación entre materia seca presente y altura en gramas nativas del trópico mexicano. *Técnica Pecuaria México* 2009; 47(1): 79-92.
3. Castro RR, Hernández GA, Aguilar BG, Ramírez RO. 2011. Comparación de métodos para estimar rendimiento de forraje en praderas asociadas. *Naturaleza y Desarrollo*. 2011; 9(1):38-46.
4. Castro RR., Hernández GA., Vaquera HH., Hernández GJ, Quero CA, Enríquez QJF, Martínez HPA. Comportamiento productivo de asociaciones de gramíneas con leguminosas en pastoreo. *Rev Fitotec Mex* 2012; 35 (1): 87-95.

5. Chavez V A., Waghorn G C., Brookes I M., Woodfield D R. Effect of maturation and initial harvest dates on the nutritive characteristics of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Animal Feed Science and Technology*, 127 (2006): 293-318.
6. Gaggia F., Baffoni L., Di Gioia D., Accorsi M., Bosi S., Marotti I., Biavati B., Dinelli G. Inoculation with microorganisms of *Lolium perenne* L.: Evaluation of plant growth parameters and endophytic colonization of roots. *New Biotechnology*; 2013 30 (6): 695-704.
7. Garduño, V. S., Pérez, P. J., Hernández, G. A., Herrera, H. J. G., Martínez, H. P. A., Joaquín, T. B. M. 2009. Rendimiento y dinámica de crecimiento estacional de Ballico perenne, pastoreado con ovinos a diferentes frecuencias e intensidades. *Técnica Pecuaria en México*. 47(2): 189-202.
8. Rancane S., Karklins A., Lazdina D., Berzins P. 2015. Biomass yield and chemical composition of perennial grasses for energy production. *Engineering for rural development*. (20): 546-551.
9. Rancane S., Karklins A., Lazdina D., Berzins P., Bardule A., Butlers A., Lazdins A. 2016. The evaluation of biomass yield and quality of *Phalaris arundinacea* and *Festulium* fertilized with bio-energy waste products. *Agronomy Research* 14(1): 198-210.
10. Rojas G. A. R., Hernández G. A., Quero C. A. R., Guerrero R. J. D., Ayala W., Zaragoza R. J. L., Trejo L. C. 2016. Persistencia de *Dactylis glomerata* L. solo y asociado con *Lolium perenne* L. y *Trifolium repens* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(4): 885-895.
11. SAS. User's Guide: Statistics (Version 9.0 ed.). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 2002.
12. Schlegel P., Wyss U., Arrigo Y., Hess H D. Mineral concentrations of fresh herbage from mixed grassland as influenced by botanical composition, harvest time and growth stage. *Animal Feed Science and Technology* 219 (2016): 226-233.
13. SigmaPlot. User's Guide (Versión 10.0). Systat software 2015.
14. Tampere M., Viiralt R. 2014. The efficiency of biogas digestate on grassland compared mineral fertilizer and cattle slurry. *Research for rural development*. (1): 89- 94.
15. Velasco, Z. M. E., Hernández, G. A., González, H. V. A. 2007. Cambios en componentes del rendimiento de una pradera de Ballico perenne, en respuesta a la frecuencia de corte. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 30(1): 79-87.
16. Velasco, Z. M. E., Hernández, G. A., González, H. V. A., Pérez, P. J., Vaquera, H. H., Galvis, S. A. 2001. Curva de crecimiento y acumulación estacional del pasto Ovillo (*Dactylis glomerata* L.). *Técnica Pecuaria en México*. 39(1):1-14.
17. Walsh J. J., Jones D. L., Edwards-Jones G., Williams A. P. 2012. Replacing inorganic fertilizer with anaerobic digestate may maintain agricultural productivity at less environmental cost. *Journal Plant Nutrition Soli Science*. (175): 840-845.

INDUCCIÓN DE CALLO *in vitro* DE MEZQUITE (*Prosopis glandulosa* TORR.)

Alejandro Ibarra López¹, Ma. del Carmen Ojeda Zacarías¹, Héctor Lozoya Saldaña², Emilio Olivares Sáenz¹, José Elías Treviño Ramírez¹, Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, ²Universidad Autónoma Chapingo.
maria.ojedazc@uanl.edu.mx

RESUMEN

El mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.), es una fabácea multipropósito nativa del continente americano, que se utiliza para la obtención de leña, carbón, madera y forraje. Su propagación se realiza por semilla, pero requiere procesos de escarificación; por tanto, es indispensable buscar alternativas eficientes, que permitan aumentar su tasa de regeneración clonal. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar las metodologías que permitan el establecimiento e inducción de callo *in vitro*, en semillas inmaduras de mezquite. Los explantes fueron desinfectados en una solución bactericida-fungicida durante 60 min, para después colocarlos en una solución de NaClO al 1.62% por 20 min y se enjuagaron con agua destilada esterilizada. Después los explantes fueron sembrados en los medios de cultivo MS, DCR y GD, presentando viabilidad y ligera formación de callo utilizando el medio MS. Posteriormente, los callos se transfirieron a medio MS con concentraciones de 2,4-D (2.26, 4.53 6.79 μM) en combinación con BAP (2.22, 4.44, 6.66 μM), en condiciones de fotoperiodo. La formación de callo *in vitro* en los explantes se contabilizó a 4 y 8 semanas. Los tratamientos con 6.79 μM de 2,4-D con 4.44 y 6.66 μM de BAP, presentaron la mayor formación de callo con 79.96 y 83.15% respectivamente, a 8 semanas de su evaluación. Estos avances demuestran el primer reporte de inducción de callo *in vitro* en *P. glandulosa*.

INTRODUCCIÓN

El cambio de uso de suelo para tipo agrícola, urbano e industrial ha provocado un descenso en el área total de zonas naturales en el mundo (FAO, 2010). En México, en la última década, el matorral xerófilo presentó la mayor pérdida en superficie, debido a la extensión que cubre este tipo de vegetación en el país (FAO y CONAFOR, 2011; Ngangyo Heya *et al.*, 2017). Este ecosistema se distribuye en el noreste del país (Foroughbakhch *et al.*, 2009); donde el 25% de la deforestación total en México está concentrada en esta área (Céspedes-Flores y Moreno-Sánchez, 2010). Este tipo de vegetación está compuesto de alrededor de 60 especies leñosas, muchas de las cuales son importantes para la producción forestal y silvopastoril (Foroughbakhch *et al.*, 2006; 2009); destacando los géneros *Acacia*, *Prosopis*, *Ebenopsis*, *Caesalpinia* y *Havardia* (Estrada y Marroquín de la Fuente, 1992).

El género *Prosopis* (Fabaceae) reúne alrededor de 50 especies, de las cuales 42 son nativas del continente americano (Arce y Medina, 1997; Andrade-Montemayor *et al.*, 2011; Henciya *et al.*, 2017). El mezquite (*P. glandulosa* Torr.), es una especie leñosa que se distribuye desde el sur de Texas, hasta el sureste de México (Martin y Alexander, 1974). Es tolerante a condiciones de sequía y permite la fijación de nitrógeno en el suelo (Golubov *et al.*, 2001; Chaires-Martínez, Salazar-Montoya y Ramos-Ramírez, 2008). Tiene múltiples usos, entre ellos la obtención de leña, carbón, madera, cortezas, forraje, gomas, consumo humano y para la fabricación de medicamentos (Arce y Medina, 1997; Bhansali, 2010). Recientemente, se ha observado su potencial como tratamiento antidiabético (George, Lochner y Huisamen, 2011); como fuente natural de antioxidantes y cardioprotector (García-Andrade *et al.*, 2013); para la obtención de galactomananos (Martínez-Ávila *et al.*, 2014); así como para la obtención de biocombustibles (Park *et al.*, 2012).

Esta especie se propaga por semilla, sin embargo, requiere procedimientos de escarificación (Arce y Medina, 1997), debido a la presencia de tegumentos impermeables (Rodríguez-Araujo *et al.*, 2017). No obstante, desde que la hibridación natural ocurre entre especies, el uso de semillas no es recomendable (Bhansali, 2010); por tanto, es necesario buscar alternativas eficientes, que permitan aumentar la tasa de regeneración clonal de esta especie. El cultivo de tejidos vegetales permite la obtención de un gran número de plantas en poco tiempo, condiciones controladas y espacios reducidos (Kumar y Loh, 2012). En estas condiciones, las células vegetales pueden proliferar en una forma desordenada y dar lugar a una masa amorfa de tejido conocido como callo (George *et al.*, 2008); estos a su vez pueden ser estimulados a desarrollar células embriogénicas, que

posteriormente experimentan cambios morfológicos y bioquímicos, para producir estructuras bipolares sin conexión vascular con el tejido embrionario (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006; Bhojwani y Dantu, 2013). Actualmente, solo existe un reporte de embriogénesis somática y regeneración para la especie *P. laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) M.C. Johnst. (Buendía-González *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue definir los diferentes medios de cultivo que permitan el establecimiento *in vitro*, de semillas inmaduras de mezquite; así como determinar las concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal que permitan la inducción de callo *in vitro*.

PARTE EXPERIMENTAL

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Agronomía UANL, de julio 2017 a enero 2018. Como material vegetal se utilizaron vainas inmaduras de mezquite (*P. glandulosa* Torr.), las cuales fueron recolectadas de árboles adultos en fructificación.

Desinfestación

Las vainas inmaduras se lavaron superficialmente con detergente líquido (Axion®, Colgate-Palmolive, Gto., México), y se enjuagaron con agua potable. Posteriormente se retiraron las semillas y se colocaron en una solución fungicida-bactericida, a base de 2.0 g L⁻¹ de Final Bacter® (sulfato de gentamicina 2.0%; clorhidrato de oxitetraciclina 6.0%; Gowan® Mexicana, Mexicali, B.C., México), 1.5 mL L⁻¹ de Amistar® Gold (azoxistrobina 18%; Syngenta®, CDMX, México) 400 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 3% de sacarosa, durante 90 min. Concluido el proceso se enjuagaron con agua bidestilada. En estas condiciones el material vegetal se llevó a la campana de flujo laminar para trabajar en condiciones de asepsia.

Dentro de la campana de flujo laminar, las semillas inmaduras fueron sumergidas en etanol absoluto por un minuto, continuando con una inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.62% (30% v/v Cloralex®, Alen, Mty, México), más 0.02% de Tween-20® por 20 min. Finalmente, los explantes se enjuagaron tres veces con agua bidestilada esterilizada e inmediatamente se mantuvieron en una solución antioxidante de PVP (polivinilpirrolidona) 400 mg L⁻¹, hasta la siembra.

Establecimiento

Las semillas inmaduras fueron sembradas en tres medios de cultivo, MS (Murashige y Skoog, 1962), DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Greshoff y Doy 1972), los cuales se adicionaron con vitaminas, 100 mg L⁻¹ de mioinositol y 3% de sacarosa y se suplementaron con 9.06 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.02 utilizando KOH o HCl 1.0 N y se solidificaron con 4.4 g L⁻¹ de Phytigel™. Posteriormente se colocaron en recipientes de vidrio de 150 mL y se esterilizaron en autoclave a 1.2 kg cm⁻² de presión durante 15 min.

Inducción de callo

Los explantes viables provenientes de la etapa de establecimiento *in vitro*, fueron transferidos a medio de cultivo MS adicionado con los componentes descritos anteriormente y se suplementaron con las concentraciones de 2.26, 4.53 y 6.79 µM de 2,4-D más la combinación con 2.22, 4.44 y 6.66 µM de 6-bencilaminopurina (BAP) y un tratamiento control sin reguladores de crecimiento. El pH fue ajustado como se describe anteriormente. Los medios se solidificaron con 4.4 g L⁻¹ de Phytigel™, se colocaron en cajas Magenta™ y se esterilizaron bajo las condiciones indicadas.

Siembra *in vitro*

Las semillas inmaduras desinfestadas provenientes de vainas de mezquite fueron sembradas en los diferentes tratamientos, en condiciones de asepsia, dentro de una campana de flujo laminar. Los medios de establecimiento con las semillas de mezquite fueron incubados a total oscuridad a 24 ± 2 °C, durante cuatro semanas para registrar la presencia de contaminación, oxidación y callogénesis. Los tratamientos de la etapa de inducción se incubaron a 24 ± 2 °C, y se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, a una intensidad lumínica de 35-40 µmol m⁻² s⁻¹ por ocho semanas.

Diseño experimental

En la etapa de establecimiento *in vitro* de semillas inmaduras, se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos (medios de cultivo) y 10 réplicas. Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de contaminación, oxidación y callogénesis en los explantes a cuatro semanas de la siembra.

Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 tratamientos (concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento: 2,4-D/BAP) y ocho réplicas.

La variable evaluada para la etapa de inducción fue el porcentaje de callo *in vitro* a 4 y 8 semanas después del subcultivo.

La unidad experimental fue un recipiente de vidrio de 150 mL o una caja Magenta™ de 250 mL con 2 a 4 explantes.

Los porcentajes de la etapa de establecimiento e inducción de callo se transformaron mediante la función *Arcoseno*. Un análisis de varianza se realizó para cada etapa y la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey $p \leq 0.05$. Los resultados se analizaron mediante el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 23.

RESULTADOS

El procedimiento de desinfección utilizado fue efectivo para el establecimiento aséptico de semillas inmaduras de mezquite, donde no se presentó contaminación por bacterias u hongos en los medios de cultivo utilizados; no se registró oxidación en las mismas, y la viabilidad fue en la totalidad de las semillas sembradas después de su evaluación (Cuadro 1). Las semillas germinaron a partir del cuarto día después de la siembra, de manera uniforme. La formación de callo fue presente en los tres medios de cultivo evaluados, superando 40% en el medio GD (Cuadro 1).

Cuadro 1. Medias y errores estándar de la formación de callo (%) en semillas inmaduras de mezquite (*P. glandulosa*), a cuatro semanas del establecimiento.

Tratamiento	% Callogénesis
1 MS	19.62 ± 7.36 ab
2 DCR	7.59 ± 4.89 b
3 GD	42.03 ± 10.05 a
Media	23.08 ± 5.31

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Inducción de callo *in vitro*

En relación con los resultados obtenidos del análisis de varianza, se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$), en las diferentes combinaciones y concentraciones de 2,4-D/BAP, destacando el tratamiento T10 con 6.79 μM 2,4-D más 6.66 μM BAP con la mayor generación de callo *in vitro*, en los tiempos evaluados (Cuadro 2). Valores inferiores se presentaron en los tratamientos T6 (4.53/4.44 μM 2,4-D/BAP), T8 (6.79/2.22 μM 2,4-D/BAP) y T9 (6.79/4.44 μM 2,4-D/BAP), con porcentajes superiores al 50% a ocho semanas del subcultivo ($p \leq 0.05$; Cuadro 2). El tratamiento control y T2 (2.26/2.22 μM 2,4-D/BAP), no presentaron formación de callo durante el primer mes de evaluación (Cuadro 2). En estos tratamientos, la coloración de los callos fue variable, de amarillo claro a verde claro y de color crema a café claro. Es importante señalar que la presencia de callo comenzó en el embrión cigótico inmaduro y se extendió a los cotiledones.

Se han realizado diversos estudios para mejorar la formación de callos mediante la optimización de factores relacionados con el medio de inducción, en particular, reguladores de crecimiento vegetal (Buendía-González *et al.*, 2012). Rai *et al.* (2007), mencionan que las auxinas, generalmente 2,4-D, se requieren en bajas concentraciones para la inducción de callo *in vitro*, combinadas con alguna citocinina como kinetina o BAP. Cabe mencionar que la inducción de callo está restringida a ciertas células de los explantes y es determinada por el grado de desarrollo del tejido (Rai *et al.*, 2007; George *et al.*, 2008).

Estos resultados son similares al estudio de Buendía-González *et al.* (2012), donde se presentó la formación de callo embriogénico en ejes embrionarios, a partir de explantes maduros e inmaduros de *P. laevigata*, con 2.26 μM 2,4-D y 6.6 μM BAP. Asimismo, con combinaciones afines de 2,4-D/BAP, se permitió la inducción de callo embriogénico en explantes de *Leucaena leucocephala* (Rastogi *et al.*, 2008); *Acacia catechu* (Rout *et al.*, 1995); *A. nilotica* (Garg *et al.*, 1996); *A. sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2002) y *A. arabica* (Nanda y Rout, 2003).

Cuadro 2. Medias y errores estándar de la inducción de callo *in vitro* (%) en semillas inmaduras de mezquite (*P. glandulosa*), a cuatro y ocho semanas del subcultivo.

Tratamiento	% Callo <i>in vitro</i>			
	Primer mes		Segundo mes	
T1 Control	0.0 ± 0.0	c	0.0 ± 0.0	d
T2 2.26 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	0.0 ± 0.0	c	4.4 ± 2.37	cd
T3 2.26 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	50.61 ± 10.52	ab	50.61 ± 10.52	ab
T4 2.26 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	29.33 ± 14.82	bc	40.59 ± 15.87	abcd
T5 4.53 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	36.17 ± 11.7	abc	36.17 ± 11.7	bcd
T6 4.53 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	49.4 ± 13.41	ab	56.24 ± 11.4	ab
T7 4.53 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	31.87 ± 14.01	bc	46.87 ± 13.72	abc
T8 6.79 µM 2,4-D + 2.22 µM BAP	43.76 ± 8.97	abc	55.01 ± 8.15	ab
T9 6.79 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP	68.71 ± 11.76	ab	79.96 ± 6.63	ab
T10 6.79 µM 2,4-D + 6.66 µM BAP	83.15 ± 6.84	a	83.15 ± 6.84	a
Media	39.31 ± 4.21		45.31 ± 4.16	

†Medias con letras iguales no son estadísticamente iguales, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

CONCLUSIONES

En la etapa de establecimiento *in vitro*, el proceso de desinfestación fue adecuado para permitir la viabilidad de las semillas inmaduras de mezquite. Mientras que, en la etapa de inducción, las mayores concentraciones de 2,4-D y BAP, permitieron la presencia y proliferación de callo *in vitro*, en los tiempos evaluados. A partir de estos resultados, se demuestra el primer estudio de la especie *P. glandulosa* en la inducción de callo.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade-Montemayor, H. M., Cordova-Torres, A. V., García-Gasca, T. & Kawas, J. R. (2011). Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Ruminant Research* 98: 83-92
- Arce, J. P. & Medina, M. C. 1997. Micropropagation of *Prosopis* species (mesquites). En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture Forestry, 39. High-Tech and Micropropagation V. Springer-Verlag Berlin*. pp. 367-380.
- Bhansali, R. R. 2010. Biology and multiplication of *Prosopis* species grown in the Thar Desert. En: Ramawat, K. G. (ed.). *Desert Plants, Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 371-406.
- Bhojwani, S. S. & Dantu, P. K. (2013). Somatic Embryogenesis. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, 17: 75-92.
- Buendía-González, L., Estrada-Zúñiga, M. E., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F. & Vernon-Carter, E. J. (2012). Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 287-296.
- Céspedes-Flores, S. E., & Moreno-Sánchez, E. (2010). Estimación del valor de la pérdida de recurso forestal y su relación con la reforestación en las entidades federativas de México. *Investigación ambiental*, 2(2): 5-13.
- Chaires-Martínez, L., Salazar-Montoya, J. A. & Ramos-Ramírez, E. G. (2008). Physicochemical and functional characterization of the galactomannan obtained from mesquite seeds (*Prosopis pallida*). *European Food Research and Technology* 227: 1669-1676.
- Estrada, C. A. & Marroquín de la Fuente, J. (1992). Leguminosas del Centro-Sur de Nuevo León. *Reporte Científico*, 10. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. 258 pp.
- FAO. (2010). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Informe principal. Roma, Italia. pp. 339.

10. FAO & CONAFOR. (2011). Situación de los Recursos Genéticos Forestales en México. Informe Final del proyecto TCP/MEX/3301/MEX (4). pp. 75.
11. Foroughbakhch, R., Alvarado-Vázquez, M. A., Hernández-Piñero, J. L., Rocha-Estrada, A., Guzmán-Lucio, M. A. & Treviño-Garza, E. J. (2006). Establishment, growth and biomass production of 10 tree Woody species introduced for reforestation and ecological restoration in northeastern Mexico. *Forest Ecology and Management* 235: 194-201.
12. Foroughbakhch, R., Hernández-Piñero, J. L., Alvarado-Vázquez, M. A., Céspedes-Cabrales, E., Rocha-Estrada, A. & Cárdenas-Avila, M. L. (2009). Leaf biomass determination on Woody shrub species in semiarid zones. *Agroforest Syst*, 77: 181-192.
13. García-Andrade, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Rosales-Castro, M. & Medina-Torres, L. (2013). Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products* 44: 336-342.
14. Garg, L., Bhandari, N. N., Rani, V. & Bhojwani, S. S. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. *Plant Cell Reports* 15: 855-858.
15. George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G. J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd ed. Springer, Netherlands.
16. George, C., Lochner, A. & Huisamen, B. (2011). The efficacy of *Prosopis glandulosa* as antidiabetic treatment in rat models of diabetes and insulin resistance. *Journal of Ethnopharmacology* 137: 298-304.
17. Golubov, J., Mandujano, M. & Eguiarte, L. E. (2001). The paradox of mesquites (*Prosopis* spp): invading species of biodiversity enhancers. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 69: 21-28.
18. Gresshoof P. M. & Doy, C. H. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, 107: 161-170
19. Gupta, P. K. & Durzan, D. J. (1985). Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, 4: 177-179.
20. Henciya, S., Seturaman, P., James, A. R., Tsai, Y. H., Nikam, R., Wu, Y. C., Dahms, H. U. & Chang, F. R. (2017). Biopharmaceutical potentials of *Prosopis* spp. (Mimosaceae, Leguminosa). *Journal of Food and Drug Analysis* 25: 187-196.
21. Kumar, P. P. & Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. En: Altman, A., P. M. Hasegawa (eds.). *Plant Biotechnology and Agriculture. Prospects for the 21st Century*. Elsevier, pp. 131-138.
22. Martin, S. C. & Alexander, R. R. (1974). *Prosopis juliflora* (Swartz) D. C. Seeds of woody plants in the United States. *Agric. Hand Book* 450: 656-657.
23. Martínez-Ávila, G. C. G., Hernández-Almanza, A. Y., Sousa, F. D., Moreira, R., Gutiérrez-Sánchez, G. & Aguilar, C. N. (2014). Macromolecular and functional properties of galactomannan from mesquite seeds (*Prosopis glandulosa*). *Carbohydrate Polymers* 102: 928-931.
24. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473-497.
25. Nanda, R. M. & Rout, G. R. (2003). *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 131-135.
26. Ngangyo Heya, M., Maiti, R., Foroughbakhch, R. & Carrillo-Parra, A. (2017). Biology, Productivity and Bioenergy of Timber-Yielding Plants. An Experimental Technology. *SpringerBriefs in Plant Science* 8, pp. 141. DOI: 10.1007/978-3-319-61798-5_1.
27. Park, S. C., Ansley, R. J., Mirik, M. & Maindrault, M. A. (2012). Delivered biomass costs of honey mesquite (*Prosopis glandulosa*) for bioenergy uses in the South-Central USA. *Bioenerg. Res.* 5: 989-1001.
28. Quiroz-Figueroa, F., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M. & Vargas, V. M. (2006). Embryo production through SE can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 86: 285-301.
29. Rai, M. K., N. Akhtar & V. S. Jaiswal. (2007). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Sci. Hort.*, 113: 129-133.

30. Rastogi, S., Rizvi, S. M. H., Singh, R. P. & Dwivedi, U. N. (2008). *In vitro* regeneration of *Leucaena leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum* 53(4): 743-748.
31. Rodríguez-Araujo, M. E., Pérez, D. R. & Bonvissuto, G. L. (2017). Seed germination of five *Prosopis* shrub species (Fabaceae-Mimosoideae) from the Monte and Patagonia phytogeographic provinces of Argentina. *Journal of Arid Environments*, 1-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aridenv.2017.07.019>
32. Rout, G. R., Samantaray, S. & Das, P. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* – a multipurpose leguminous tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 283-285.
33. Vengadesan, C., Ganapathi, A., Ramesh Anbazhagan, V. & Prem Anand, R. (2002). Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – *Plant* 38: 52-57.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL FRENTE A *FUSARIUM EQUISETI*

Laura Jeannette García Barrera¹, Jeisel Delgado Flores¹, Stefani Aletse Meza Zamora¹, Francisco Roberto Quiroz Figueroa², Diana Ortiz Gamino³, Gisela Aguilar Benítez³, Javier Ruiz Romero¹ y Laura Leticia Barrera Necha⁴

¹Instituto Politécnico Nacional - CIBA, ²Instituto Politécnico Nacional - CIIDIR Sinaloa, ³Universidad Autónoma de San Luis Potosí, ⁴ Instituto Politécnico Nacional - CEPROBI.

RESUMEN

México es el segundo productor de chile en el mundo. Se dedican alrededor de 150 mil hectáreas anuales al cultivo con una producción de aproximadamente 2 millones de toneladas del producto. El cultivo de chile Mirasol (*Capsicum* spp.) es económicamente importante en el estado de Zacatecas, debido a que contribuye con más de 51% de la producción nacional de chile. Las enfermedades fúngicas son una fuente importante de estrés en las plantas y son responsables de una gran cantidad de pérdidas anuales de cultivo. El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGP) para mejorar los rendimientos de las plantas y el control biológico de las enfermedades que las afectan, se ha convertido en una alternativa al uso de fertilizantes químicos y pesticidas. Uno de los hongos fitopatógenos que se ha aislado e identificado en la semilla de esta especie de chile es *Fusarium equiseti*. En este trabajo se evaluó la capacidad antagonica en placa contra este hongo, de 17 cepas bacterianas de una colección de microorganismos que presentan cualidades de PGP. Se evaluó en estas cepas su capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y potasio, además de determinar su capacidad de producir ácido indol acético, ácido giberílico y sideróforos. Los mejores porcentajes de inhibición contra *Fusarium equiseti* fueron 54.95, 59.95, 62.26 y 63.06 %, que corresponden a las cepas identificadas como, *Bacillus toyonensis*, *Ewingella americana*, *Pseudomonas gessardii* y *Pseudomonas chlororaphis*, respectivamente. Es por ello que estas cepas son candidatas para formular un bioprotector para ser usados como alternativa al uso de agroquímicos para el control de *Fusarium equiseti* aislado de semillas de chile Mirasol.

INTRODUCCIÓN

La actividad agropecuaria en México es de gran importancia en el sector productivo nacional, debido a que es una fuente de ingresos económicos y provisión de alimentos tanto para las poblaciones rurales como para las poblaciones urbanas. Desde el punto de vista agrícola, uno de los cultivos de mayor importancia económica, cultural y gastronómica es el chile (*Capsicum* spp.). Este ocupa el octavo lugar dentro de los cultivos con mayor valor económico, alcanzando alrededor de 13 mil millones de pesos (mdp) anuales, con un volumen de producción promedio de 2.2 millones de toneladas, de las cuales se exportan cerca de 900 mil toneladas de chiles frescos y secos (SAGARPA, 2016).

A pesar de que el chile es un cultivo económicamente rentable, los productores se enfrentan a una compleja problemática general provocada por sequías, enfermedades, malezas, ataque de plagas, control de los precios y mercados para la venta de su producto, alto costos de los insumos y los costos indirectos de producción (alquiler de maquinaria y equipo). La atención a esta compleja problemática se ha orientado principalmente al uso de sistemas eficientes de riego, control químico e integrado de plagas y enfermedades y a los intentos de organización para su comercialización (Carrillo, 2014).

Sin embargo, año con año han notado la producción de frutos heterogéneos en tamaño y color. Esto último es importante, pues a pesar de tratarse de un cultivo comercial, una pequeña proporción de productores utilizan semilla mejorada y cerca del 90% continúan sembrando semilla criolla o tradicional, debido a que su experiencia los hace conocedores de que los frutos obtenidos de cultivares tradicionales cumplen mejor con las características demandadas por el mercado nacional en cuanto a tamaño, forma, peso de pulpa y sabor.

Para suplir la creciente demanda de alimentos es común el uso de agroquímicos; sin embargo el uso excesivo de estos puede traer consecuencias ambientales y a la salud, es por ello que surge la necesidad de formular fertilizantes orgánicos. Los digestatos son sustancias ricas en nutrientes producidas por la digestión anaeróbica de compuestos orgánicos, es material no digerible y

microorganismos muertos. Todo el nitrógeno, fósforo y potasio presente en la materia prima permanecerá en el digestato ya que estos no están presente en el biogás. Por su parte la composta es producida por microorganismos aerobios, lo que significa que requieren oxígeno del aire. La adición de digestatos y composta al suelo proporciona estabilidad y una fuente de nutrientes disponibles a corto plazo y tienen efectos positivos sobre las propiedades biológicas del suelo, como la biomasa microbiana y las actividades enzimáticas. Se aislaron microorganismos de muestras del suelo, composta y digestato en medios selectivos NBRIP, Pikovskaya, Ashby, NFB y medios para el aislamiento de *Lysobacter*, *Varioborax*, *Azospirillum* y *Paenibacillus*. Un total de 152 cepas (47 del suelo, 42 de composta y 63 del digestato) se aislaron como cultivo puro y luego se evaluaron como PGP mediante la producción de ácido indol acético, ácido giberélico, sideróforo y germinación de semillas. Se seleccionaron 40 bacterias que muestran efectos de PGP, finalmente, se seleccionaron 17 aislamientos para evaluar su efecto antagónico contra *Fusarium equiseti* aislado de semillas de chile mirasol.

TEORÍA

El chile es uno de los cultivos originarios de Mesoamérica, y México es el principal centro de diversidad genética, de esta forma es un sitio estratégico para la conservación y el aprovechamiento de este recurso (Lesur, 2006). La riqueza genética del chile se encuentra distribuida a todo lo largo y ancho del país (SINAREFI, 2013). Sus distintas variedades se adaptan a diversos climas y tipos de suelos, lo que ha contribuido a su exitosa y amplia distribución geográfica (Aguirre & Muñoz, 2015); sin embargo, a pesar de la evidente importancia del cultivo de chile, en los estudios sobre conservación de los recursos fitogenéticos se ha documentado que el género sufre una fuerte erosión genética como consecuencia de la sustitución de variedades criollas, por el ataque de plagas y enfermedades (Latournerie *et al.*, 2012).

A nivel mundial la producción de chile ha tenido un crecimiento importante en los últimos 10 años; este aumento se debe a la demanda de este producto en todas sus presentaciones (fresco, seco y procesado), tanto para consumo directo como para usos industriales.

México ocupa el segundo lugar con el 6.5% de la producción mundial de chile; a pesar de esto, el cultivo ocupa el octavo lugar con mayor valor generado por la agricultura nacional, alcanzando alrededor de 13 mil millones de pesos anualmente, con un volumen de producción promedio de 2.2 millones de toneladas, del cual se exportan cerca de 900 mil toneladas de chiles frescos, secos y en preparaciones (SAGARPA, 2015).

El estado de Zacatecas contribuye con más del 51 % de la producción nacional de chile, siendo los municipios de Morales, Fresnillo, Villa de Cos, Guadalupe, Calera y Enrique Estrada los principales productores. En el estado se siembran anualmente entre 30 mil y 40 mil hectáreas y es de gran importancia para la economía de Zacatecas ya que genera cerca de 35% del PIB estatal agropecuario y emplea en forma directa a cerca de seis millones de jornales anuales (INIFAP, 2016). La condición sanitaria de las semillas está dada por la presencia de patógenos, principalmente hongos, bacterias y virus, los cuáles pueden estar dentro de las semillas. Muchos de estos patógenos son causantes de baja germinación y/o de la producción de plántulas enfermas que no prosperarán en plantas adultas en el campo.

El hecho de diseñar variedades resistentes o tolerantes a ciertas enfermedades no es suficiente para obtener una semilla de calidad sanitaria. Sin embargo, existen metodologías para disminuir las enfermedades. Algunas de estas metodologías son el uso de una semilla original sana, sanidad de los campos, rotación de los cultivos, aislamiento, producción en regiones exentas de enfermedades, producción en épocas apropiadas protección de cultivos, tratamientos de las semillas, cosechas oportunas, secamiento oportuno y correcto almacenamiento (CIAT, 1991).

La aplicación de normas de calidad en el área de biología es más compleja de lograr o ajustar; por ejemplo, los microorganismos llevados por las simientes (ambos organismos vivos) interactúan con el ambiente modificando sus comportamientos continuamente a través del tiempo (incluso, en breves períodos); por lo que puede ser común una variabilidad en los resultados de ensayos entre laboratorios (Gally & Giachino, 2015).

La interpretación del término biofertilizante es muy amplia, pero de manera sintetizada, podemos decir que son productos que contienen microorganismos, que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas; además le ayudan a su nutrición y protección (Grageda,

Díaz, Peña, & Vera, 2012). Los biofertilizantes aplicados al suelo y/o planta se usan con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos. Los microorganismos utilizados en los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: El primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al stress por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta. El segundo grupo incluye microorganismos los cuales son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos. Puede haber microorganismos que puedan estar en los dos grupos, que además de promover el crecimiento de la planta, inhiba los efectos de microorganismos patógenos.

PARTE EXPERIMENTAL

Las pruebas de antagonismo entre las bacterias elegidas y *Fusarium equiseti*, se realizaron en medio PDA. Se prepararon inóculos de las bacterias con una concentración aproximada de 10^8 células, desde caldo nutritivo con 24 horas de incubación a 30°C y 110 RPM. Se prepararon discos de 5mm de diámetro del patógeno aislado en PDA con ayuda de sacabocados estériles. En las placas de PDA, se sembró un disco del patógeno en el centro de la caja y posteriormente se hicieron dos estrías del inóculo de Bacterias con 25 μL cada una, a 15mm de cada lado del disco. Los testigos fueron preparados sembrando el patógeno únicamente. Las cajas fueron incubadas por 12 días, a temperatura ambiente. Por último se tomó la medida del crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* (diámetro) diario y se calculó el índice de inhibición con la formula,

$$I = [(C-T)/C] \times 100$$

donde I es la inhibición (%), C es el diámetro del micelio del testigo y T es el diámetro del micelio del tratamiento (Ospina Valenzuela Tatiana Karen, 2014).

Las cepas seleccionadas fueron evaluadas en cuanto a su potencial promotor de crecimiento vegetal siguiendo las siguientes metodologías:

Producción de ácido indol acético (IAA): La producción de este fitoregulador se detectó mediante una prueba colorimétrica utilizando el reactivo de Salkowski; los cultivos bacterianos se ajustaron a un mismo inóculo 10^8 ufc/ml mediante la escala de MacFarland, estos se dejaron crecer en Caldo Nutritivo durante 120 horas a 110 rpm y 28°C por duplicado; una vez pasado el tiempo de inoculación se utilizó un volumen de 1.5 ml de cada duplicado y se centrifugo a 5000 rpm durante 5 min., se tomó 500 μL del sobrenadante el cual se mezcló con el reactivo de Salkowski a una relación 1:4, la mezcla se dejó en oscuridad durante 30 min después se realizó la lectura en espectrofotómetro a 530 nm, para comparar la producción se utilizó un estándar de IAA. La prueba se toma como positivo cuando se ve el cambio a color rojo (León Mendoza, 2010).

Producción de giberelinas: La producción de este fitoregulador se detectó mediante una prueba colorimétrica utilizando el reactivo de ácido fosfomolibdico o Folling-wu siguiendo la metodología utilizada para la producción de IAA; la lectura en espectrofotómetro se realizó a 780 nm, para comparar la producción se utilizó un estándar de Giberelinas. La prueba se toma como positivo cuando se ve el cambio a color violeta-azul (Graham & J.H.M. Henderson, 1960).

Producción de sideróforos: La producción de sideróforos se evaluó siguiendo la metodología utilizada para la producción de IAA. Se mezclarán volúmenes iguales del sobrenadante y el reactivo Cromo azurol-S (CAS), se incubó 15 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm, los valores más negativos indican mayor concentración de sideróforos en el sobrenadante (Balado Dacosta, 2009).

RESULTADOS

Se evaluó la capacidad antagonica contra *Fusarium equiseti* de 17 cepas bacterianas de la colección de microorganismos del grupo de trabajo de CIBA. Cinco de estas cepas mostraron un porcentaje de inhibición por arriba del 50%. De las cepas evaluadas, S corresponde a cepas aisladas de suelo, C a cepas aisladas de composta y D a cepas aisladas de digestato.

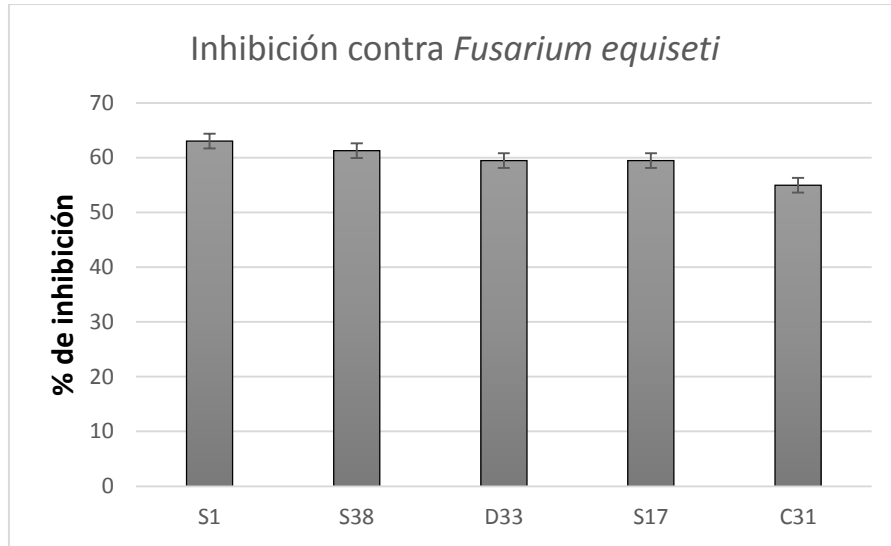


Fig1. Porcentaje de inhibición de las 5 mejores cepas evaluadas

Se evaluaron algunas propiedades promotoras de crecimiento vegetal como es la producción de ácido indol acético, ácido giberlico, y sideróforos.

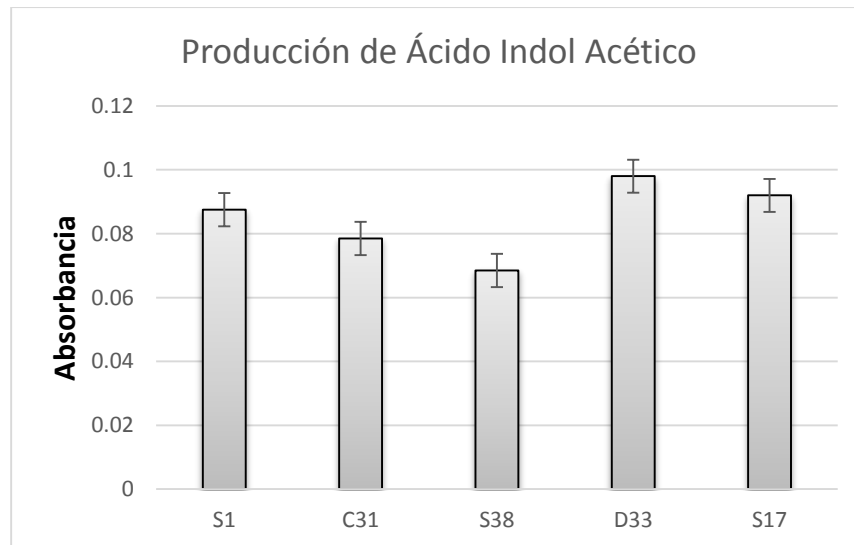


Fig 2. Producción de ácido indol acético de las 5 cepas que inhibieron el crecimiento de *Fusarium equiseti*

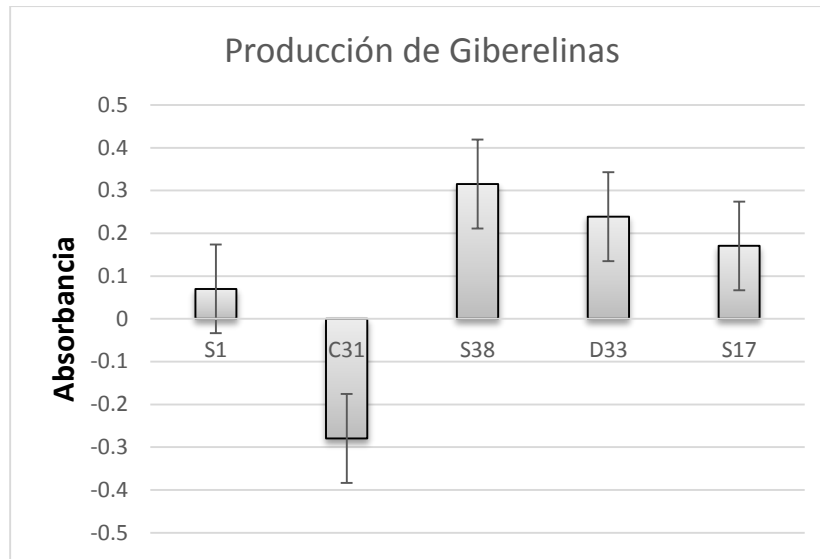


Fig. 3 Producción de giberelinas de las cepas que inhibieron el crecimiento de *Fusarium equiseti*

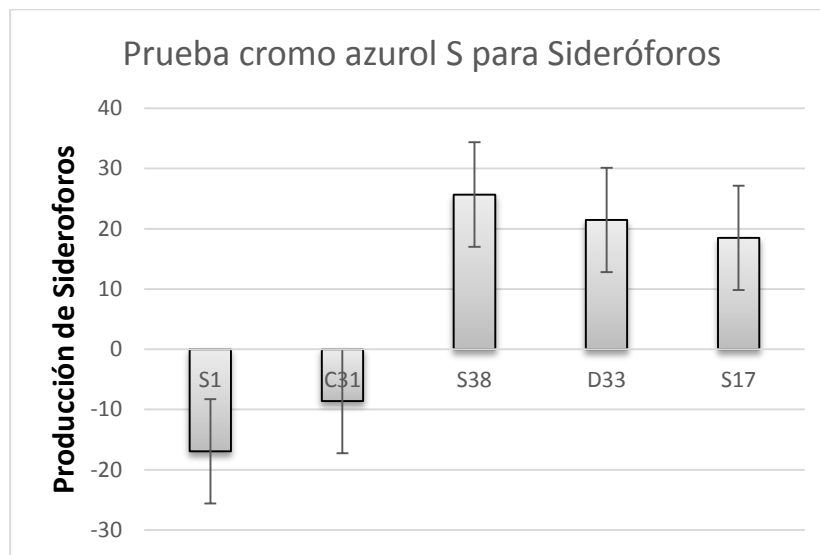


Fig 4. Producción de sideróforos de cepas antagonicas a *Fusarium equiseti*

En cuanto a los resultados de antagonismo contra *Fusarium equiseti*, las mejores cepas fueron S1, que fue identificada como *Pseudomonas chlororaphis*, quien además produce AIA y giberelinas. La cepa S38, fue identificada como *Pseudomona gessardii* y produce AIA, giberelinas y sideróforos. Las otras cepas que fueron efectivas en cuanto a la inhibición del crecimiento radia de *F. equiseti* fueron las cepas S17 y D33, que fueron identificadas como *Ewingella americana* y prodicen AIA, giberelinas y sideróforos. La cepa C31 fue identificada como *Bacillus toyonensis* y produce únicamente AIA. Para formular un bioprotector contra *Fusarium equiseti*, se pueden evaluar estas cepas de forma independiente o como consorcio.

CONCLUSIONES

De las 17 cepas evaluadas, 5 corresponden a composta, 7 a suelo y 4 a digestato. Lo que demuestra que los microorganismos del suelo, aunque son menos diversos, son los mas especializados para favorecer el crecimiento vegetal. De la misma forma en composta, donde se llevan a cabo procesos degradativos, hay una menos especialización de microorganismos de importancia agrícola. De las cepas que tienen actividad antagonista contra *Fusarium equiseti*, son tres de suelo, una de composta

y una de digestato, lo que una vez mas demuestra la selección que se ejerce sobre los sustratos la actividad que se lleva a cabo para su generación y uso. Cabe resaltar, que de las 17 cepas evaluadas, se pueden utilizar tanto de forma individual o en consorcios como biofertilizantes y/o bioprotectores. En la siguiente etapa se evaluarán de forma individual las cepas S1, C31, S38, D33 y S17 contra otros fitopatógenos aislados de semillas de chile mirasol con la finalidad de formular un bioprotector para la promoción del crecimiento de las plantas, que es el primer paso para mejorar la productividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, E., & Muñoz, V. 2015. El chile como alimento. Revista de la Academia Mexicana en Ciencias, 66 no.3, 16 p.
2. Balado Dacosta, M. (2009). Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*., 240. Recuperado a partir de <https://books.google.com/books?id=IsyV6AtMKHcC&pgis=1>
3. Carrillo, C. J. 2014. Caracterización y Análisis Socioeconómico Y Ambiental Del Sistema De Producción De Cosecha Del Municipio de Morales, Zacatecas. 2014, de UASLP. 2 p
4. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1991. Control de calidad en el campo, beneficios y almacenamiento de semillas. Colombia: Centro internacional de agricultura tropical, CIAT. 78 p.
5. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2013. Selección y conservación de semilla de chile: primer paso para una buena cosecha. Folleto Técnico Núm. 51. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. 43 p
6. Gally, T. & Giachino, M. 2015. Ensayos de semillas en Argentina: normativas para su acreditación. Avances en Investigacion Agropecuaria. 19 (1): 69-75.
7. Grageda, O., Díaz, A., Peña, J., & Vera, J. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261–1274.
8. Graham, H. D., & J.H.M. Henderson. (1960). Reaction of gibberellic acid and gibberellins with Folin-Wu phosphomolybdic acid reagent and its use. *Plant Physiology*, (4), 405–408.
9. Latournerie, L., López, P., Ramírez, M., Corona T., López H. & Villalón H. 2012. Los recursos genéticos del chile (*Capsicum* spp.) en México: estudio, conservación y utilización. 2017, de SAGARPA, SNICS y SINAREFI Sitio web: <http://snics.sagarpa.gob.mx/rfaa/Documents/Hortalizas/resejec10chile.pdf>
10. León Mendoza, L. H. (2010). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria*, 177–185.
11. Lesur, L. 2006. Manual del cultivo de chile: una guía paso a paso. México: Trillas.32 p.
12. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2016. Producción del chile mexicano. 2015, de SAGARPA Sitio web: <http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/produccion-del-chile-mexicano>
13. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. Qué son los Recursos Fitogenéticos. 2017, de SAGARPA Sitio web: <http://snics.sagarpa.gob.mx/rfaa/Paginas/MacroRedes.aspx>
14. Sistema Nacional de Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura SINAREFI. 2013. Red Chile. Sitio web: http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Capsicum/Informe_Final/Informe%20final%20Capsicum.pdf

DIÓXIDO DE TITANIO BENEFICIA EL COLOR Y LA CANTIDAD DE LICOPENO EN TOMATES SOMETIDOS A ESTRÉS SALINO

Víctor Hugo Carbajal-Vázquez, Libia Iris Trejo-Téllez, Fernando Carlos Gómez-Merino, Gabriel Alcántar-Gonzalez, Prometeo Sanchez-García, Sara Monserrat Ramírez-Olvera, María de la Luz Buendía-Valverde

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, carbajal.víctor@colpos.mx; tlibia@colpos.mx; fernandg@colpos.mx; alcantar@colpos.mx; promet@colpos.mx; ramirez.sara@colpos.mx; luzmaria_buendia@hotmail.com

RESUMEN

Concentraciones diferentes de dióxido de titanio y cloruro de sodio fueron evaluadas en el color y cuantificación de licopeno en frutos de tomate cv. Rio Supremo. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar en un arreglo factorial. El primer factor fue la concentración de cloruro de sodio (NaCl), evaluado a los niveles 0, 50 y 100 mM. El segundo factor fueron aplicaciones foliares de dióxido de titanio (TiO₂) a tres concentraciones (0, 75 y 100 mg L⁻¹, resultando nueve tratamientos en el experimento. La luminosidad y el ángulo Hue aumentaron conforme se incrementó la concentración de NaCl en la solución nutritiva; por otro lado, el índice de saturación disminuyó en comparación con el testigo, en el tratamiento 50 mM, mientras que con 100 mM no hubo diferencias significativas. Por otra parte, la aplicación foliar de TiO₂ en ambas concentraciones evaluadas redujo la luminosidad significativamente; mientras que no influyó en el ángulo Hue. La adición de NaCl a la solución nutritiva disminuyó significativamente la concentración de licopeno del fruto en comparación con el testigo. Estos decrementos fueron del orden de 30.9 y 63.2% para niveles de 50 y 100 mM. El efecto principal de la aspersión foliar de Ti no fue significativo en la concentración de licopeno del fruto. Se concluye que el cloruro de sodio afectó de manera diferencial parámetros de color y negativamente la concentración de licopeno, mientras que el Ti no presentó efectos diferenciales en parámetros de color y no tuvo incidencia en el licopeno.

INTRODUCCIÓN

México, en 2015 fue el exportador número uno de tomate a nivel mundial y en los últimos años ha sido el décimo productor. La producción de esta hortaliza genera alrededor de 350 mil plazas laborales y cerca de 100 millones de jornales (FAOSTAT, 2017; SAGARPA, 2015).

La calidad de un cultivo depende directamente de factores bióticos y abióticos, que influyen tanto en su composición química, como en la morfológica y organoléptica, factores como plagas y enfermedades, condiciones climáticas, acidez de suelo, fertilización, y salinidad entre otras (Kaniszewski, 1982). Los parámetros de calidad se pueden definir de dos maneras, según el destino del fruto; 1) comercialización en fresco o 2) la agroindustria, cuando se destina al consumo en fresco los parámetros son: color, firmeza, forma, tamaño, y sabor (Fraser *et al.*, 1994). Cuando es dirigido a la agroindustria la exigencia se centra en parámetros como acidez titulable, peso seco, pH, sólidos solubles totales, y viscosidad (Renquist y Reid, 1998). Las pérdidas de calidad pueden suceder por daño mecánico, almacenamiento inadecuado, manipulación, y transporte incorrecto, Fluck y Halsey (1973) mencionaron que malos manejos al fruto de tomate, pueden causar daños metabólicos y fisiológicos, que dan una apariencia anormal externa, de igual manera, Moretti y Sargent (2000) aportan que el daño se refleja en alteraciones en el metabolismo respiratorio, sabor y firmeza.

El titanio (Ti) es un metal de transición considerado elemento benéfico por los aportes que presenta en plantas superiores, Kleiber y Markiewicz (2013), mencionan que el Ti es funcional como bioestimulante y reportaron incrementos significativos en el rendimiento comercial y en el crecimiento de tomate, a su vez, encontraron que es un potenciador de N, P y K, al registrarse contenidos altos de estos elementos en plantas tratadas con concentraciones altas de Ti, aunque no descubrieron efectos significativos en el contenido de azúcares, acidez y materia seca. En la actualidad las investigaciones relacionadas con la calidad del fruto de tomate se han enfocado más en analizar y seleccionar variedades, con características muy específicas, tales como, resistencia a plagas, tolerancia a sequías, o que tengan una calidad visualmente atractiva. Sin embargo, se tienen pocos estudios acerca del efecto del manejo agronómico, dentro del cual se considera el uso de bioestimulantes entre ellos los elementos benéficos, en características organolépticas del fruto,

según López-Vidal *et al.* (2014), en los últimos años se ha observado mayor demanda por aquellos productos con mejor sabor y aroma, además del color y tamaño. Debido a lo anterior, se evaluó el efecto del titanio en la variable color y concentración de licopeno en frutos del segundo racimo de plantas de tomate sometidos a salinidad

PARTE EXPERIMENTAL

El experimento se llevó a cabo en un invernadero tipo túnel con ventana cenital. Se emplearon semillas de tomate híbrido F-1 Río Supremo de porte determinado, con un porcentaje de germinación de 85%. Para la obtención de plántulas, las semillas se sembraron en una charola de 200 cavidades usando turba como sustrato.

El sustrato utilizado en las macetas fue tezontle (partículas de 5 a 6 mm). El riego se realizó mediante un sistema por goteo en espagueti. Se colocaron 9 tanques de 200 L, cada contenedor contaba con una bomba de ½ HP, un ramaleo de PVC con regreso al tanque regulado con una válvula y una línea de salida con un filtro de anillos, esta se conectaba a una manguera negra agrícola de 16 mm con tres goteros por contenedor, cada gotero contaba con una cruceta para cuatro tubines y cada tubín con una estaca, de esta manera, se tenían 12 macetas irrigadas por línea

Se estableció un experimento con el objetivo de evaluar el efecto del elemento benéfico aplicado vía foliar en plantas de tomate sometidas a estrés salino. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar en un arreglo factorial 3². El primer factor fue la concentración de cloruro de sodio (NaCl), evaluado a los niveles 0,50 y 100 mM. El segundo factor fueron aplicaciones foliares del elemento benéfico Ti en tres concentraciones (0, 75 y 100 mg L⁻¹), resultando nueve tratamientos. Cada tratamiento tuvo nueve repeticiones. La unidad experimental consistió en una planta sembrada en una bolsa a una distancia de 0.3 m de separación entre plantas y 0.8 m entre hileras. La adición de NaCl a la solución nutritiva se efectuó a los 30 días después del trasplante (DDT); mientras que las aspersiones foliares se comenzaron a los 31 DDT, estas se hicieron mediante ocho aplicaciones a intervalos de diez días entre ellas, cada aspersion se realizó a las seis de la mañana bañando las plantas hasta punto de goteo, en promedio cada planta se asperjo con 50 mL de solución por aplicación. Para ayudar a que la solución asperjada se adhiriera a la lámina foliar se le agregó surfactante Tween™ 20 con una concentración de 0.5 g L⁻¹. La fase experimental de la investigación se contabilizó a partir del trasplante, la duración fue de 108 días.

Determinación de variables de color. Los parámetros de color L (luminosidad), a (tonalidades de color verde con valores negativos o positivos para rojo) y b (valores negativos con tonalidades hacia el amarillo o positivo hacia el azul) se determinaron en dos puntos opuestos de la zona ecuatorial de cada fruto usando un colorímetro (Hunter Lab, modelo D25-PC2; Con los datos obtenidos en los parámetros antes mencionados, se calcularon el índice de saturación (croma) y el ángulo Hue como se describe a continuación:

$$\text{Croma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$\text{Hue} = \arctan (b/a)$$

Determinación de Licopeno. Se estimó la concentración de licopeno empleando la ecuación siguiente propuesta por Arias y colaboradores (2000):

$$\text{Licopeno (mg 100 g}^{-1} \text{ peso fresco)} = 11.848 \times (a/b) + 1.5471$$

Donde "a" y "b" son los parámetros obtenidos con el colorímetro.

Con los resultados obtenidos se realizaron análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey. En las pruebas estadísticas aplicadas se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. En estos análisis se usó el software SAS (SAS, 2011).

RESULTADOS

Color. La adición en tres niveles de NaCl (0, 50, y 100 mM) vía fertirriego presenta efectos diferenciales en la luminosidad, tono (ángulo Hue), y el índice de saturación (Croma) del fruto (Figura 1a).

La luminosidad y el ángulo Hue aumentan conforme se incrementa la concentración de NaCl en la solución nutritiva; por otro lado, el índice de saturación disminuye en comparación con el testigo, en el tratamiento 50 mM, mientras que con 100 mM no hay diferencias significativas. Por otra parte, la aplicación foliar de TiO₂ en ambas concentraciones evaluadas reduce la luminosidad

significativamente; por el contrario el Ti guarda una relación positiva con el croma (índice de saturación); mientras que no influye el ángulo Hue (Figura 1b).

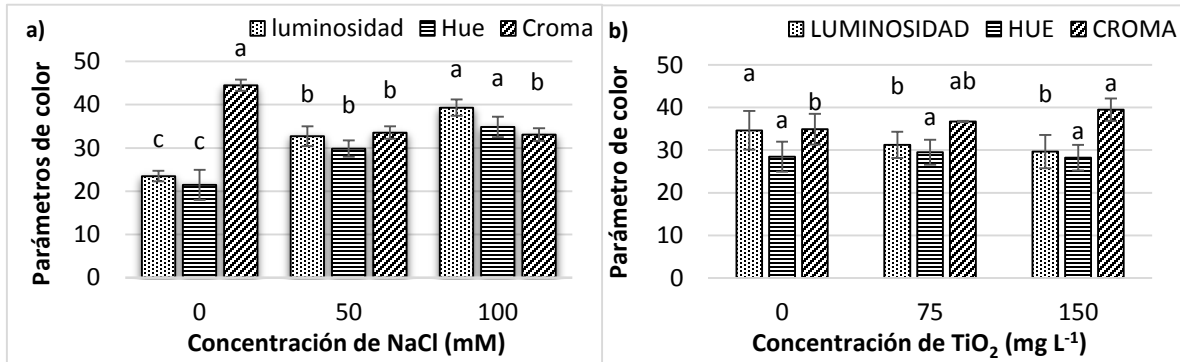


Figura 1. Efectos principales del NaCl (a) y TiO₂ (b) en los atributos del color de frutos de tomate. Medias ± DE con letras distintas en cada subfigura y variable, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P ≤ 0.05).

En la Figura 2 se presenta el efecto de la interacción de los factores de estudio en los atributos del color de frutos. Se observa que el de Ti aplicado vía en ausencia de salinidad, no tuvo influencia en la luminosidad, hue y croma. Por otra parte, en los tratamientos con 50 mM de NaCl, la dosis de Ti guarda una relación negativa con la luminosidad; mientras que con el tratamiento 50-150 se presenta un aumento significativo en el índice de saturación (croma), respecto al testigo. En los tratamientos con alta salinidad (100 mM NaCl), el Ti no tuvo efectos significativos en los atributos de color.

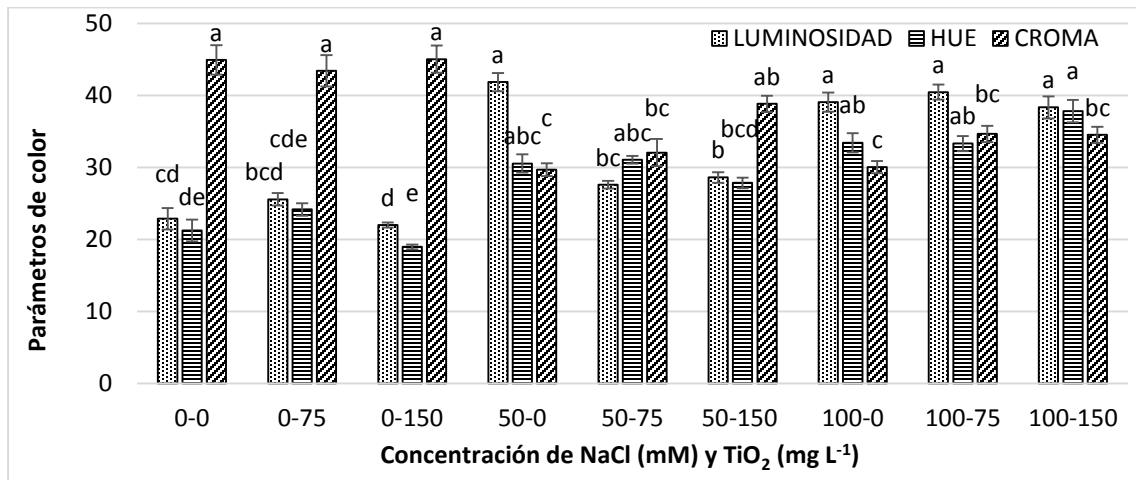


Figura 2. Efectos interactivos del NaCl y TiO₂ en los atributos del color de frutos de tomate. Medias ± DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P ≤ 0.05).

Licopeno. La adición de NaCl a la solución nutritiva disminuyó significativamente la concentración de licopeno del fruto (Figura 3a) en comparación con el testigo. Estos decrementos fueron del orden de 30.9 y 63.2% para niveles de 50 y 100 mM, respectivamente, con reducción promedio de 36.7%. El efecto principal de la aspersión foliar de Ti no fue significativo en la concentración de licopeno del fruto (Figura 3b).

En la Figura 4 se presenta el efecto de la interacción de los factores de estudio en la concentración de licopeno en frutos, mismo que fue significativo. Se observa que bajo condiciones salinas (50 y 100 mM de NaCl) en la solución nutritiva, disminuye significativamente el contenido de licopeno del fruto, independientemente de la dosis de Ti suministrado vía foliar. Por otra parte, el Ti solo presentó efectos significativos en la concentración de licopeno de fruto, en ausencia de salinidad.

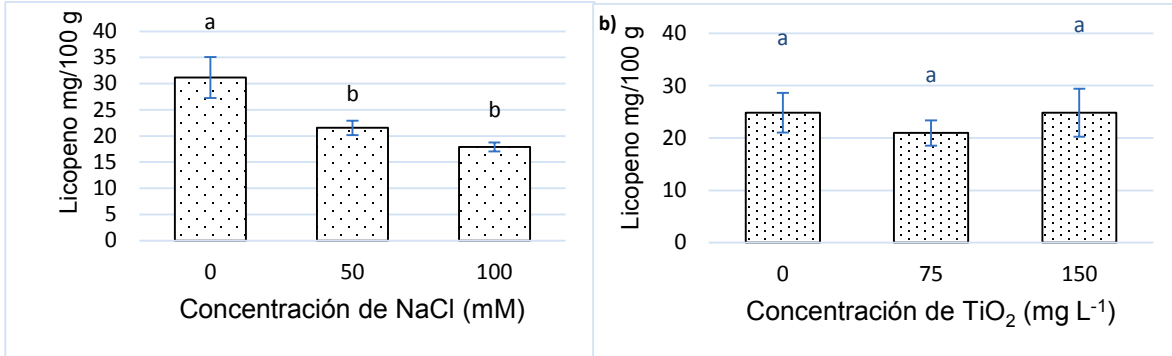


Figura 3. Efectos principales del NaCl (a) y TiO₂ (b) en la concentración de licopeno en frutos de tomate. Medias \pm DE con letras distintas en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

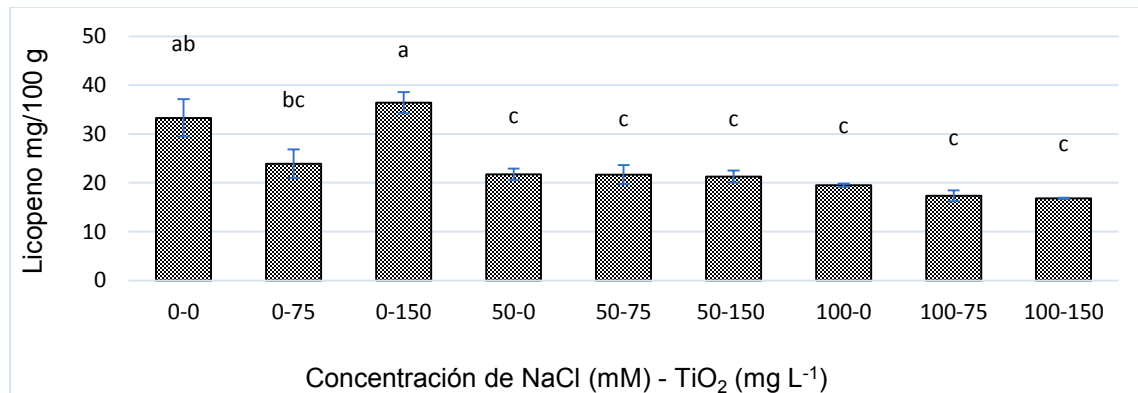


Figura 4. Efectos interactivos del NaCl y TiO₂ en la concentración de licopeno en frutos de tomate. Medias \pm DE con letras distintas, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

El NaCl incrementa significativamente luminosidad y ángulo Hue, contrariamente reduce el índice de saturación croma y la concentración de licopeno. El Ti presenta efectos negativos en luminosidad y positivos en croma, sin embargo no influye en ángulo Hue y en la concentración de licopeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. L. Moretti, S. A. Sargent, "Alteração de sabor e aroma em tomates causado por impacto", *Scientia Agricola*, Vol. 57, 2000, pp. 385-388.
2. FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estadísticas por país del cultivo de tomates frescos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2017. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (Mayo, 2017).
3. O. López-Vidal, H. Escalona-Buendía, C. Pelayo-Saldívar, J. Cruz-Salazar, J. M. Villa-Hernández, F. Rivera-Cabrera, O. Villegas-Torres, I. Alia-Tejacal, L. J. Pérez-Flores, F. Díaz de León-Sánchez, "Carotenoides, capacidad antioxidante y compuestos volátiles del aroma

- durante la maduración del jitomate”, Revista Internacional de Botánica Experimental Fiton, Vol. 83, 2014, pp. 185-192.
4. P. D. Fraser, M. R. Truesdale, C. R. Bird, W. Schuch, P. M. Bramley, “Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development”, Plant Physiology, Vol. 105, 1994, pp. 405-413.
 5. R. A. Renquist, J. B. Reid, “Quality of processing tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit from four bloom dates in relation to optimal harvest timing”, New Zealand Journal of Crop Horticultural Science, Vol. 26, 1998, pp. 161-168.
 6. R. C. Fluck, L. H. Halsey, “Impact forces and tomato bruising”, Florida Agricultural Experiment Station Journal Series, 5109, 1973, pp. 239-242.
 7. S. Kaniszewski, “Influence of irrigation and nitrogen fertilization on the yield and plants nutrient status of leek”, Biuletyn Warzywniczy, Vol. 26, 1982, pp. 95-106.
 8. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Se consolida México como primer exportador mundial de tomate. Boletín de la Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2015.
 9. T. Kleiber, B. Markiewicz, “Application of “Tytanit” in greenhouse tomato growing”, Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, Vol. 12, 3, 2013, pp. 117-126.

USO DE AMORTIGUADORES PARA REDUCIR LA ACIDOSIS RUMINAL SUBCLÍNICA *IN VITRO*.

Sánchez Mendoza Berenice

INIFAP CENID-FyMA, sanchez.berenice@inifap.gob.mx

RESUMEN

Algunos buffers sirven mantener un equilibrio ácido-base en el metabolismo cuando el rumiante es alimentado con dietas altas en grano, sin embargo, en algunos casos estos presentan un bajo desempeño para controlar los problemas de acidosis, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar diferentes amortiguadores para reducir la acidosis ruminal subclínica *in vitro*. Se determinó, la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (MS), lactato total y la capacidad buffer en tratamientos con maíz y maíz tratado con α -amilasa, adicionando como buffers; bicarbonato de sodio (BS), anhídrido ftálico, cloruro de potasio (KCL), en dosis de 1 y 2%. El análisis estadístico se realizó por un diseño de bloques generalizados completamente al azar y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey y con contrastes ortogonales de interés. El maíz tratado con α -amilasa presentó una mayor digestibilidad en comparación al maíz sin α -amilasa ($P > 0.05$). El bicarbonato de sodio presentó una capacidad buffer más alta en comparación con los otros buffers ($P > 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre dosis ($P < 0.05$). El lactato aumentó a las 24 h de fermentación, ($P < 0.05$). Ningún amortiguador logró mantener una estabilidad al transcurrir las horas de fermentación, sin embargo, algunos lograron aumentar ligeramente su capacidad buffer a las 24 h.

INTRODUCCIÓN

La producción de ácidos grasos volátiles (AGV), provoca un descenso en el pH del rumen, lo cual varía de acuerdo al grado de fermentación del alimento, ya que las bacterias encargadas de dicha fermentación son sensibles a los descensos de pH y como consecuencia en determinados momentos pueden dejar de trabajar. El exceso de granos en la dieta promueve el descenso de pH debajo de 5.5, lo cual causa una elevada producción de ácido láctico, el cual normalmente se encuentra presente en el tracto digestivo, pero únicamente en concentraciones bajas, pero cuando los carbohidratos se incrementan abruptamente, el lactato puede acumularse y por lo tanto causar una acidosis ruminal (Häubi, 2004). Se debe buscar un equilibrio ácido base, para evitar dicha acidosis ruminal, una de las formas de lograr este equilibrio es por medio de buffers ya que estos sirven mantener un equilibrio ácido-base en el metabolismo cuando el rumiante es alimentado con dietas altas en grano, sin embargo, en algunos casos estos presentan un bajo desempeño para controlar los problemas de acidosis, por lo que el objetivo del estudio fue evaluar diferentes sustancias con el propósito de identificar minerales que sirvan como buffers o sean agentes alcalinizantes, que ayuden a controlar el grado de acidez causado por una alimentación intensiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 tratamientos: 1 y 2) Maíz con 1 y 2% de Cloruro de potasio (KCL (J.T.Baker)); 3 y 4) Maíz con 1 y 2% de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 (Alyt)); 5 y 6) Maíz con 1 y 2 % de anhídrido ftálico ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{CO})_2\text{O}$, Meyer); 7 y 8) Maíz tratado con α -amilasa con 1 y 2% de KCL; 9 y 10) Maíz tratado con α -amilasa con 1 y 2% de NaHCO_3 ; 11 y 12) Maíz tratado con α -amilasa con 1 y 2 % de Ftalato ácido de potasio. Se determinaron los cambios en la digestibilidad *in vitro* con la técnica de Tilley y Terry (1963), a las 24 horas, realizando 3 incubaciones por tratamiento. El líquido ruminal se obtuvo de dos bovinos canulados, las muestras se molieron a 1 mm y se incubaron 0.5 g con 4 ml de buffer y 10 ml de líquido ruminal. Se determinó la capacidad buffer de los tratamientos antes y después de cada incubación (Jasaitis *et al.* 1987), utilizando agua destilada a un pH 7, adicionando 0.5 g de muestra con 10 ml de NaOH, midiendo el pH inicial y titulando con HCL al 0.1N. Para la determinación de la capacidad buffer residual se utilizó el residuo de la digestibilidad *in vitro*, en donde al detener las fermentaciones, las muestras eran centrifugadas a 5000 g durante 30 min, el sobrenadante se eliminaba y se realizaban los procedimientos de Jasaitis *et al.* (1987).

El lactato se determinó usando la enzima lactato deshidrogenasa (Brown *et al.*, 2000). En donde se utilizaron 0.4 ml de ácido metafosfórico al 25% para detener la fermentación. Posteriormente las

muestras fueron centrifugadas a 550 rpm durante 15 min; se utilizaron diferentes diluciones (1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50) del sobrenadante y se adicionó 0.005 ml de sulfato de cobre al 4%, 6 ml de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras se colocaron en baño maría hirviente durante 5 min, y posteriormente fueron enfriadas, para adicionarles 0.1 ml de p-hidroxidifenil. La muestra se colocó nuevamente en baño maría durante 30 min a 30°C, posteriormente se colocaron 90 s en agua hirviente y se enfriaron con agua a 20°C, y la absorbancia fue registrada en el espectrofotómetro Varian Cary 1Ema 560 nm. El análisis estadístico se realizó con un diseño de bloques generalizados completamente al azar (usando el día de incubación como criterio de bloque) y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey, (Steel y Torrie, 1996). También se realizaron contrastes ortogonales para lactato, digestibilidad y para capacidad Buffer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los tratamientos sin α -amilasa (cuadro 1), el bicarbonato de sodio presento una mayor CB antes de iniciar la fermentación, sin embargo, a las 24 h el KCL al 1% y el $C_6H_4(CO)_2O$ 1% y 2% presentaron mejor CB.

Cuadro 1. Capacidad Buffer de los tratamientos antes y después de la fermentación (meq x 10⁻³).

Tratamiento	Sin α -amilasa		Con α -amilasa	
	0 h	24 h	0 h	24 h
NaHCO ₃ 1%	310.40 ^f	148.06 ^{cde}	167.94 ^{ghi}	125.60
NaHCO ₃ 2%	438.86 ^e	139.25 ^{cde}	207.76 ^{gh}	124.04
KCL 1%	126.01 ^{ia}	183.11 ^b	173.46 ^{ghi}	113.75
KCL 2%	95.76 ^a	107.26 ^{bcde}	191.27 ^{ghi}	114.81
$C_6H_4(CO)_2O$ 1%	128.95 ^{ia}	171.64 ^{bc}	148.14 ^{hia}	118.82
$C_6H_4(CO)_2O$ 2%	155.24 ^{hia}	173.40 ^{bc}	151.14 ^{hia}	162.46 ^b
EEM	11.23	14.13	11.23	14.13

EEM: error estándar de la media

abcd; Medias dentro de columnas con distinta literal son diferentes (P<0.05)

En el Cuadro 2, no se observaron diferencias en la digestibilidad *in vitro*.

Cuadro 2. Digestibilidad *in vitro* de MS (%).

Tratamiento	Sin α -amilasa	Con α -amilasa
NaHCO ₃ 1%	69.32	72.81
NaHCO ₃ 2%	73.49	67.03
KCL 1%	84.54	81.28
KCL 2%	55.75	41.96
$C_6H_4(CO)_2O$ 1%	61.04	40.94
$C_6H_4(CO)_2O$ 2%	67.50	43.96
EEM	12.37	12.37

EEM: error estándar de la media

El en cuadro 3 se observa el contenido de lactato, el cual fue mayor para los tratamientos de NaHCO₃ 1 y 2% que contenía α -amilasa. Esto puede deberse a que la adición de α -amilasa la cual afecta la producción de acetato y aumentan el lactato, (Russell y Tsuneo, 1985).

Cuadro 3. Lactato total (mM).

Tratamiento	Sin α -amilasa	Con α -amilasa
NaHCO ₃ 1%	0.1183 ^c	1.5600 ^{ab}
NaHCO ₃ 2%	0.1550 ^{bc}	2.7567 ^a
KCL 1%	0.1033 ^c	0.1367 ^c
KCL 2%	0.1683 ^{bc}	0.1283 ^c
C ₆ H ₄ (CO) ₂ O 1%	0.1650 ^{bc}	0.0983 ^c
C ₆ H ₄ (CO) ₂ O 2%	0.0867 ^c	0.1117 ^c
EEM	0.2455	0.2455

EEM: error estándar de la media

abcd; Medias dentro de columnas con distinta literal son diferentes (P<0.05)

El bicarbonato es un sistema buffer universal que se encarga de mantener el equilibrio acido- base (Krehbiel *et al.*, 1995), este es parte de la saliva de los rumiantes y el uso de este en las dietas ayuda a incrementar el pH del rumen, beneficiando a las bacterias y protozoarios del rumen (Häubi, 2004), e incrementando la tasa de dilución ruminal lo cual reduce la degradación de la proteína de la dieta y disminuye la producción de propionato (Candanosa *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

En los tratamientos sin α -amilasa, el bicarbonato de sodio presento una mayor CB antes de iniciar la fermentación, sin embargo, a las 24 h el KCL al 1% y el C₆H₄(CO)₂O 1% y 2% presentaron mejor CB, el contenido de lactato fue mayor para los tratamientos de NaHCO₃ 1 y 2% que contenía α -amilasa. Es necesario realizar pruebas con un mayor intervalo de tiempo para observar la estabilidad de los buffers. Por otra parte, es necesario realizar un monitoreo prolongado de las variaciones del pH, para observar los momentos críticos en los cuales es necesario una mayor acción por parte del buffer.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown, M.S., C. R Krehbiel, M. L Galyean, M. D Remmegas, J.P.Peters, B. Hibbard, J. Robinson y W.M. Moseley. 2000. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. *J. Anim. Sci.* 78, 3155-3168.
2. Candanosa, E. 2003. Efecto de modificadores de la fermentación ruminal sobre el equilibrio acido-base y electrolítico en rumiantes con acidosis ruminal. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.
3. Candanosa, E., G. D. Mendoza y R. Salcedo. 2005. Efecto de bicarbonato de sodio y glucosa sobre la fermentación ruminal, equilibrio ácido-base y química sanguínea en borregos. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XV, N° 1, 41-48.*
4. Häubi, S.C.U., 2004. Teoría acido-básico de Stewart: aplicaciones prácticas de una nueva teoría de la regulación del pH en los sistemas biológicos. Cigome. 231pp.
5. Jasaitis, D.K., J.E. Wolth., J.L. Evans. 1987. Influence of feed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 70: 1391-1430.
6. Krehbiel, C.R., R. A. Britton., D.L. Harmon., T. J. Wester., y R. A. Stock. 1995. The effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. *J. Anim. Sci.* 73:3111–3121.
7. Russell, J.B. y T. Hino. 1985. Regulation of lactate production in *streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J. of Dairy Sci.* Vol. 68, No. 7.
8. Tilley, J.M.A., y R.A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassld. Soc.* 18: 104-111.

VOLUMEN Y CONSUMO DE SOLUCIONES CON CLORURO DE COBALTO Y SACAROSA EN LA VIDA DE FLORERO DE LA ORQUÍDEA *LAELIA ANCEPS* SUBESP. *ANCEPS*

María de la Luz Buendía-Valverde, Olga Tejada-Sartorius*, Libia Iris Trejo-Téllez,

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, *olgats@colpos.mx; tlibia@colpos.mx;
luzmaria_buendia@hotmail.com

RESUMEN

Un gran número de especies de orquídeas tienen una relativa larga vida de florero. *Laelia anceps* subesp. *anceps* tiene un promedio de vida de 19 días después de la antesis de la primera flor como planta en maceta, pero no existen reportes del periodo de vida de sus flores cortadas. Existen reportes del efecto del cobalto (Co) en parámetros poscosecha de plantas ornamentales. Se investigó el efecto del Co en combinación con la sacarosa en el abatimiento de volumen, consumo de la solución y vida de florero de tallos florales de dicha especie. Se analizaron diferentes concentraciones de CoCl_2 con niveles de 0, 0.1, 0.2 y 0.3 mM, así como concentraciones de sacarosa, con niveles: 0, 2 y 3 %. Las concentraciones de 0.3 mM Co + 2% sacarosa y de 0.1 mM Co + 3% sacarosa presentaron el menor abatimiento de volumen. El tratamiento sin Co y sin sacarosa presentó el mayor consumo total de la solución. La concentración con 0.1 mM Co + 2% sacarosa y la de 0.3 mM Co + 3% sacarosa aumentaron la vida de la flor cortada por 6.2 y 5.5 días respectivamente, en relación con el tratamiento de 0.2 mM Co + 3% sacarosa. Se concluye que las diferentes combinaciones de cloruro de cobalto con sacarosa disminuyen el consumo de la solución. La concentración de 0.3 mM Co + 3% sacarosa incrementa la vida de florero de *Laelia anceps* subesp. *anceps*.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento y alargamiento de la vida de florero de las flores cortadas es el mayor problema de los exportadores de orquídeas comerciales (Teixeira da Silva, 2013).

Las soluciones preservadoras alargan la vida de las flores porque actúan sobre uno o varios procesos que determinan su senescencia. Arriaga y Guerrero (1995) indican que se utilizan soluciones conservadoras conteniendo carbohidratos, principalmente sacarosa y glucosa y soluciones con inhibidores de etileno para prevenir los efectos de senescencia. Entre los inhibidores de etileno más exitosos en el alargamiento de la vida de florero de flores cortadas se encuentran el tiosulfato de plata (STS); nitrato de plata (AgNO_3); ácido aminooxiacético (AOA), 1-metil-ciclopropano (1-MCP) (Teixeira da Silva., 2003). Asimismo, se ha reportado que el uso de inhibidores de la producción de etileno, tales como níquel (Ni) o cobalto (Co), mantienen la calidad de flores por un periodo más largo e incrementan la vida de florero de algunas especies de ornamentales (Mandujano-Piña *et al.*, 2010).

El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes concentraciones de cobalto en combinación con sacarosa en la solución de florero, en el abatimiento de volumen, consumo de la solución y vida de florero de tallos florales de *Laelia anceps* subesp. *anceps*.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal. Se utilizaron tallos florales de *Laelia anceps* subesp. *anceps*, cosechados en un horario de 8:00 a 9:00 h, y cortados con una longitud de 40 cm. La cosecha de tallos se hizo cuando el primer botón floral del racimo se encontró en el estado E6D, de acuerdo con Tejada-Sartorius *et al.* (2017).

Se realizó un experimento con arreglo factorial 4x3, donde el primer factor de estudio fue el CoCl_2 con niveles de concentraciones: 0, 0.1, 0.2 y 0.3 mM. El segundo factor fue la sacarosa con niveles de concentraciones: 0, 2 y 3%. Los tallos florales cortados se asignaron a los tratamientos resultantes de la combinación factorial, y se colocaron en vasos de vidrio, con seis repeticiones. Para el tratamiento sin cobalto y sin sacarosa, se usó agua destilada. Cada tallo en un vaso contó como la unidad experimental. Se usó un volumen inicial de soluciones de 250 mL.

Los tallos florales se mantuvieron en cámara de crecimiento, equipada con luz led rojo-azul con intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y permanecieron con un fotoperiodo de 9/15 h, y temperatura constante de $17 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como variables de estudio, se consideraron: i) abatimiento del volumen de la solución a través del tiempo. Los datos se midieron cada tercer día y hasta la senescencia de la primera flor, ii) consumo total de solución en la senescencia de la primera flor; iii) vida de la flor desde el corte del tallo floral hasta la senescencia de la primera flor.

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) y prueba de comparación de medias (Tukey, α 0.05), con el paquete estadístico SAS (SAS, 2011).

RESULTADOS

De manera general, del día tres al día 17 se presentaron diferencias significativas entre medias de tratamientos en el abatimiento del volumen de la solución, en donde de manera constante el tratamiento T4 (0.3 mM Co + 2% sacarosa), así como el T5 (0.1 mM Co + 3% sacarosa) presentaron el menor abatimiento de volumen. El T7 (0.3 mM Co + 3% sacarosa) en cambio, presentó el mayor abatimiento de la solución a través del tiempo. El T3 (0.2 mM Co + 2% sacarosa) y el T6 (0.2 mM Co + 3% sacarosa) también presentaron disminución significativa del volumen, aunque de manera menos constante que el T4 y el T7, en el periodo indicado (Figura 1).

Al día de la senescencia, el tratamiento sin Co y sin sacarosa presentó el mayor consumo total de la solución, siendo superior a los tratamientos con 0.2 y 0.3 mM Co + 2% sacarosa, y a los de 0.1 y 0.2 mM Co + 3% sacarosa. Destaca que el mayor consumo total en dicho tratamiento (sin Co y sin sacarosa) fue 45% mayor que en 0.2 mM Co + 3% sacarosa (Figura 2). Estos resultados son similares a lo que Mandujano-Piña *et al.* (2012) reportaron, ya que mencionan que el consumo de solución fue menor con 0.1 mM + 4% sacarosa para tallos de *Lilium*. Asimismo, es similar a lo que Kazemi y Aremi (2012) encontraron, en el sentido de que diferentes concentraciones de Co (0, 1 y 2 mM) disminuyeron el consumo de agua de Lily "Prato".

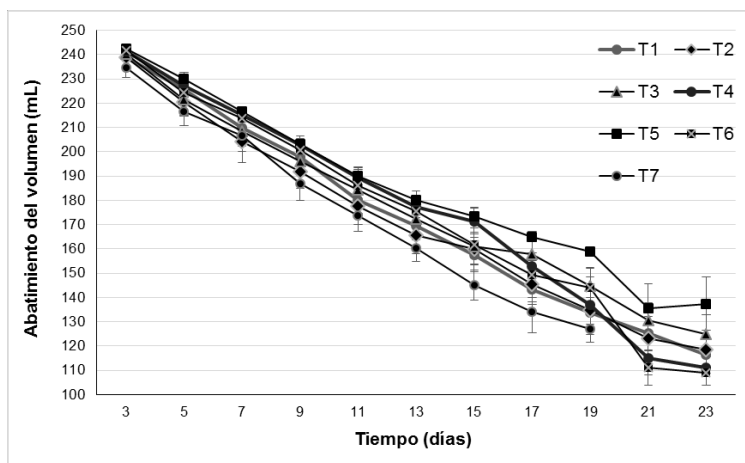


Figura 1. Abatimiento del volumen de solución a través del tiempo por tallos florales de *Laelia anceps* subesp. *anceps*, con diferentes concentraciones de CoCl_2 (mM) y de sacarosa (%): T1 sin CoCl_2 y sin sacarosa; del T2 al T4 con 0.1, 0.2 y 0.3 mM CoCl_2 más 2% de sacarosa. Del T5 al T7 con 0.1, 0.2 y 0.3 mM CoCl_2 , más 3% de sacarosa. Medias de seis repeticiones con barra de desviación estándar.

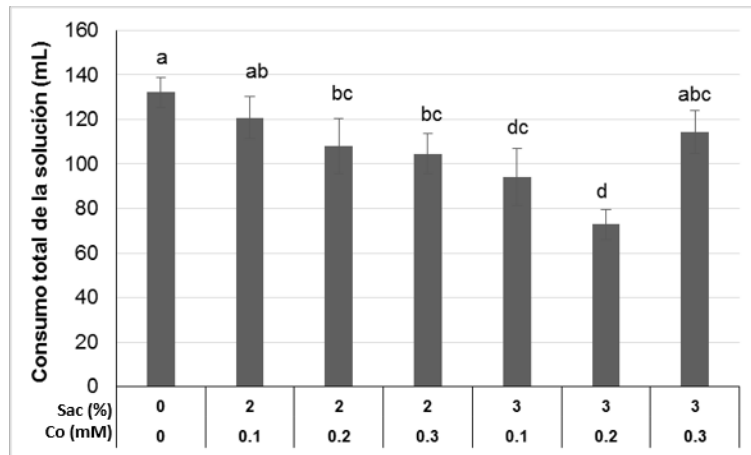


Figura 2. Consumo total de soluciones con diferentes concentraciones de CoCl_2 y de sacarosa, por tallos florales de *Laelia anceps* subesp. *anceps*, desde la cosecha hasta la senescencia de la primera flor del racimo. Medias \pm DE con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

En cuanto a la vida de la flor, se presentaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de soluciones preservadoras poscosecha, de manera que la concentración con 0.1 mM Co + 2% sacarosa y la de 0.3 mM Co + 3% sacarosa aumentaron la vida de la flor cortada por 6.2 y 5.5 días, respectivamente, en relación con el tratamiento de 0.2 mM Co + 3% sacarosa (Figura 3). Estos resultados son similares a los de Mandujano-Piña *et al.* (2012) quienes al usar soluciones con sacarosa al 4% y diferentes concentraciones de Co (0.0, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mM), y encontraron que 0.1 y 0.2 mM Co retrasaron los síntomas de senescencia de los tallos florales de *Lilium*. Por su parte, Jamali y Rahemi (2011) encontraron que diferentes concentraciones de CoCl_2 (50, 75, 100 mg L^{-1}) incrementaron la vida de florero de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.).

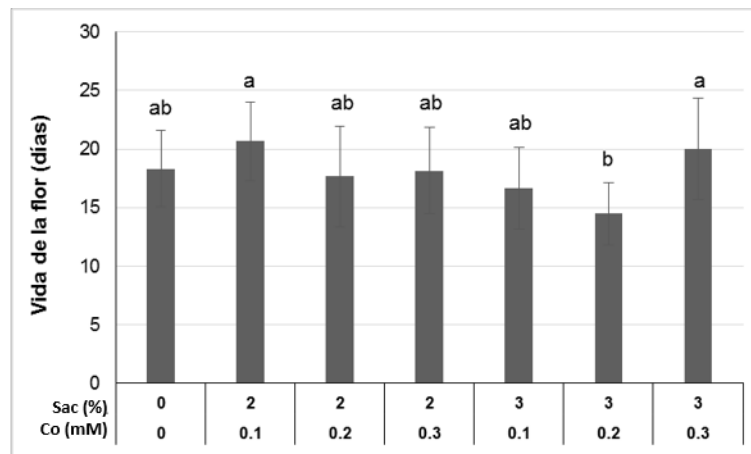


Figura 3. Vida de la flor de tallos florales de *Laelia anceps* subesp. *anceps*, desde la cosecha hasta la senescencia de la primera flor del racimo, tratados con soluciones de diferentes concentraciones de CoCl_2 y de sacarosa. Medias \pm DE con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

Las concentraciones de 0.3 mM Co + 2% sacarosa y de 0.1 mM Co + 3% sacarosa presentaron el menor abatimiento de volumen. El tratamiento sin cobalto y sin sacarosa presentó el mayor consumo

total de la solución, por lo que las diferentes combinaciones de cloruro de cobalto con sacarosa disminuyen el consumo de la solución.

La solución con 0.1 mM Co + 2% sacarosa y la de 0.3 mM Co + 3% sacarosa aumentaron la vida de la flor cortada por 6.2 y 5.5 días, respectivamente, en relación con el tratamiento de 0.2 mM Co + 3% sacarosa. Este último tratamiento presentó el menor consumo total de la solución y la menor vida de florero.

Se observan resultados positivos al usar combinaciones de cloruro de cobalto y sacarosa para aumentar la vida poscosecha de tallos de *Laelia anceps* subesp. *anceps*, por lo que se sugiere mayor investigación en las concentraciones de las soluciones preservadoras utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. B. Jamali, M. Rahemi, "Carnation Flowers Senescence as Influenced by Nickel, Cobalt and Silicon", *Journal of Biological & Environmental Sciences*, Vol. 5, 2011, pp. 147-152.
2. J. A. Teixeira da Silva, "Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology", *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, Vol. 7, 2013, pp. 1-52.
3. J. A. Teixeira da Silva, "The cut flower: postharvest considerations", *Online Journal of Biological Sciences*, Vol. 3, 2003, pp. 406-442.
4. M. Kazemi, A. Ameri, "Effect of Ni, CO, SA and Sucrose on Extending the Vase-Life of Lily Cut Flower", *Iranica Journal of Energy & Environment*, Vol. 3, 2012, pp. 162-166.
5. M. Mandujano-Piña, M. T. Colinas-León, A. M. Castillo-González; I. Alía-Tejacal, L. A. Valdez-Aguilar, "Cobalto como retardante de la senescencia de liliium híbrido oriental en postcosecha", *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Vol. 18, 2012, pp. 239-252.
6. N. R. M. Arriaga, J. E. Guerrero, "Efecto de diferentes soluciones preservativas en la vida de florero de tallos florales de "Polaris" bajo dos condiciones ambientales", *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Vol. 1, 3, 1995, pp. 103-107.
7. O. Tejeda-Sartorius, M. A. A. Téllez-Velasco, L. I. Trejo-Téllez, "Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. Alternativa de aprovechamiento sustentable *ex situ*", *Agroproductividad*, Vol. 10, 2017, pp. 37-45.
8. SAS Institute Inc., *SAS/STAT Users Guide. Version 9.3* (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA), 2011.

CERIO REDUCE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y AMINOÁCIDOS EN PLANTAS DE ARROZ EN ETAPA VEGETATIVA

Sara Monzerrat Ramírez-Olvera¹, Libia Iris Trejo-Téllez^{1*}, Fernando Carlos Gómez Merino¹, Juan Antonio Pérez Sato², Cesar Antonio Casasola Elizondo¹, María de la Luz Buendía Valverde¹, Víctor Hugo Carbajal Vázquez¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ramirez.sara@colpos.mx; tlibia@colpos.mx*; fernandg@colpos.mx; casasola.cesar@colpos.mx; buendia.luz@colpos.mx; carbajal.victor@colpos.mx

²Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, pantonio@colpos.mx

RESUMEN

Los elementos benéficos son aquellos no considerados esenciales para plantas superiores, sin embargo, promueven el metabolismo vegetal y pueden aportar múltiples beneficios. En este contexto el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición de Ce a partir de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, en la solución nutritiva en concentraciones 0, 25, 50 y 100 μM en la concentración de clorofilas y aminoácidos en plantas de arroz. Plántulas de 12 d de edad se transfirieron a un sistema hidropónico con solución Magnavaca por 7 d, posteriormente en solución Yoshida. Catorce días después se adicionaron los tratamientos con Ce. Después de 28 d del inicio de tratamientos las plantas se cosecharon y se determinó la concentración de clorofila y de aminoácidos solubles totales en hojas; los aminoácidos también fueron cuantificados en raíces. La concentración de clorofila total se redujo 30.1% con la aplicación de 100 μM Ce; mientras que, la concentración de aminoácidos libres totales en vástagos se redujo 23.2% con la aplicación de 100 μM Ce. En raíces, la aplicación de 50 μM Ce disminuyó 32.3% la concentración de aminoácidos respecto al testigo. La aplicación de Ce en etapa vegetativa a plantas de arroz Morelos A-98 afectó de manera negativa las concentraciones de clorofila y aminoácidos.

INTRODUCCIÓN

El arroz es un cultivo de suma importancia para la población mundial; es el alimento básico en países de Asia, América Latina y África, y proporciona el 20% de las calorías consumidas en el mundo; además de ser buena fuente de vitaminas B y E, riboflavina, tiamina y niacina (Calpe, 2006; Seck *et al.*, 2012).

Actualmente el arroz se produce en diversos países de Asia, América Latina y África y es el alimento básico en la dieta de más de mil millones de personas, las cuales dependen de este cultivo para su sustento (Kubo y Purevdorj, 2004; Borresen y Ryan, 2014). En México se consumen 6 kg per cápita de arroz, sin embargo, la producción nacional no abastece este consumo lo que implica la importación del 80% del grano para abastecer la demanda (SAGARPA, 2014). Por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas que mejoren la producción, en este contexto la nutrición vegetal es de suma importancia.

Existen otros elementos que a pesar de no ser considerados elementos esenciales, promueven el crecimiento y mejoran las características de las plantas, cuya función depende de la concentración del elemento y de la especie vegetal. Estos elementos son llamados elementos benéficos, los cuales son útiles para algunas plantas pero no son esenciales para todo el reino vegetal. Estos elementos pueden promover el crecimiento, mejoran la resistencia a factores de estrés biótico como daño por patógenos y herbivoría, así como y factores abióticos como sequía, salinidad y toxicidad o deficiencia de nutrimentos. En esta clasificación se encuentra el elemento cerio (Ce) (Pilon-Smits *et al.*, 2009; Trejo-Téllez *et al.*, 2016).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de 25, 50 y 100 μM Ce a partir de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a plantas de arroz Morelos A-98.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal y tratamientos

Se utilizaron semillas de arroz del cultivar Morelos A-98, obtenidas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, campo experimental Zacatepec Morelos. Las semillas se geminaron en medio MS suplementado con sacarosa 3%. Posteriormente las semillas

se colocaron en oscuridad por 3 d y a luz natural por 11 d. Después, las plántulas se transfirieron a recipientes de 14 L con solución nutritiva Magnavaca y siete días después se reemplazó la solución Magnavaca por solución Yoshida. Catorce días después del trasplante, se adicionaron 25, 50 y 100 μM de CeCl_3 a la solución nutritiva. A los 28 d de la aplicación de tratamientos las plantas se retiraron de la solución nutritiva, se separaron las muestras en vástago y raíz y se maceraron con nitrógeno líquido.

Determinación de clorofila total y aminoácidos libre totales

De tejido previamente macerado de vástago y raíz se tomaron 60 mg y realizó una triple extracción etanólica (80, 80 y 50%). En cada extracción, las muestras fueron incubadas en baño María a 80 °C durante 20 min y centrifugadas a 14000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes de cada extracción se recuperaron y se mezclaron. La concentración de clorofilas a y b se determinó en vástago, leyendo los extractos a 635 y 645 nm en un espectrofotómetro y mediante la suma de la concentración de clorofila a y b se determinó la concentración de clorofila total. La concentración de aminoácidos libres totales se determinó en vástago y raíz utilizando el método de la ninhidrina (Moore, 1954) y las muestras se analizaron a 570 nm. Se empleó L-leucina para la elaboración de la curva estándar.

Análisis estadístico

A los datos de concentración de clorofila total en vástago y concentración de aminoácidos totales en vástago y raíz se les realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

La adición de 25 y 50 μM Ce no afectó significativamente la concentración de clorofila total, mientras que la adición de 100 μM Ce disminuyó significativamente en 30.11%, respecto al testigo (**Figura 1**). Lo anterior es acorde a lo reportado por Chen *et al.* (2015), quienes indican que la adición de 10 a 100 μM $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ a células en suspensión de ginkgo (*Ginkgo biloba*) incrementó gradualmente la concentración de clorofila a y b, mientras que la aplicación de 500 a 5000 μM $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ disminuyó significativamente las concentraciones de estas moléculas.

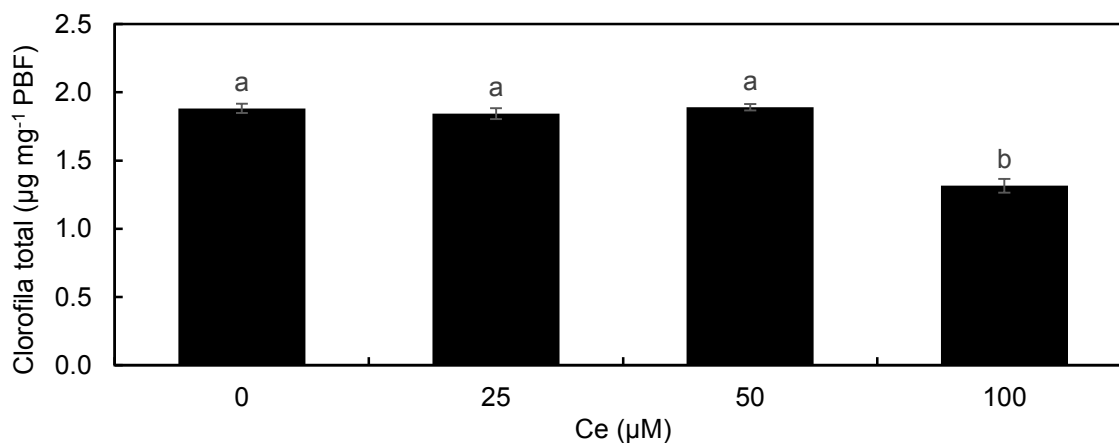


Figura 1. Concentración de clorofila total en plantas de arroz tratadas con Ce. PBF: Peso de Biomasa Fresca. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

La concentración de aminoácidos en vástago no incrementó significativamente con la adición de 25 y 50 μM Ce, mientras que la adición de 100 μM Ce disminuyó la concentración en 23.23%. En cuanto a la concentración de aminoácidos en raíz, la adición de 25, 50 y 100 μM Ce no afectó significativamente la concentración de aminoácidos (Figura 2). De manera coincidente otros estudios indican que la adición de $n\text{CeO}_2$ a 125, 250 y 500 mg kg^{-1} (726.3, 1452.6 y 2905.1 μM de Ce) a plantas de trigo no incrementó la concentración total de aminoácidos en granos (Rico *et al.*, 2014).

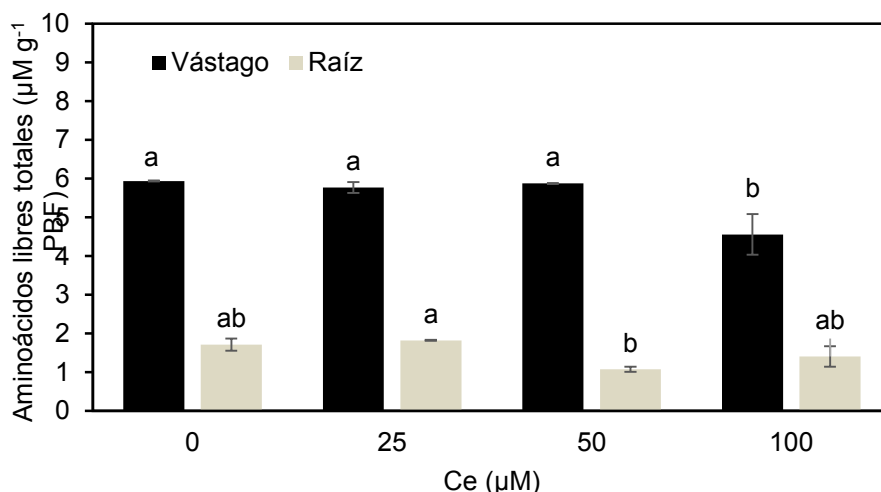


Figura 2. Concentración de aminoácidos libres totales en plantas de arroz tratadas con Ce. PBF: Peso de Biomasa Fresca. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

La aplicación de Ce a plantas de arroz Morelos A-98 disminuye la concentración de clorofila y aminoácidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. Calpe. Rice International Commodity Profile. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2006.
2. C. M. Rico, S. C. Lee, R. Rubenecia, A. Mukherjee, J. Hong, J. R. Peralta-Videa, J. L. Gardea-Torresdey. Cerium oxide nanoparticles impact yield and modify nutritional parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food Chem.* Vol. 62, 2014, pp. 9669-9675.
3. E. C. Borresen, E. P. Ryan. Rice bran: a food ingredient with global public health opportunities. *Wheat Rice Dis. Prev. Health.* Vol. 22, 2014, pp. 301-310.
4. E. A Pilon-Smits, C. F. Quinn, W. Tapken, M. Malagoli, M. Schiavon. Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 12, 3, 2009, pp. 267-274.
5. J.A. Rodríguez-Robles, E. J. Melendez, J.D. Ackerman, "Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Compartmentia falcata* (Orchidaceae)", *Am. J. Bot.*, Vol. 79, 9, 1992, pp. 1009-1017.
6. Kubo M, Purevdorj M. 2004. The future of rice production and consumption. *J. Food Distr. Res.* 35(1): 128-142.
7. L. I. Trejo-Téllez, F. C. Gómez-Merino, G. Alcántar-González. Elementos benéficos: potencialidades y limitaciones. In: *Nutrición de Cultivos. Segunda Edición.* Alcántar-González G, Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC. (eds.). Montecillo: Ed. Colegio de Postgraduados. 2016. pp. 59-101.
8. S. Moore, W. H. Stein. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* Vol. 211, 1954, pp. 907-913.
9. SAGARPA. 2014. Importa México el 80% de arroz para solventar su consumo. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/colima/boletines/Paginas/2014B102.aspx>. Accesado el 01 de abril de 2018.
10. P. A. Seck, A. Diagne, S. Mohanty, M. C. Wopereis. Crops that feed the world 7: Rice. *Food Security*, Vol. 4, 1, 2012, pp.7-24.

11. Y. Chen, Y. Luo, N. Qiu, H. Fei, L. Sheng, R. Wang. Ce³⁺ induces flavonoids accumulation by regulation of pigments, ions, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes in suspension cells of *Ginkgo biloba* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* Vol. 123, 2, 2015, pp. 283–296.

CRECIMIENTO DE BACILLUS SUBTILIS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Eduardo Rodríguez Cuevas, Jesús Alarcón Bonilla y Paola Solís Vences

Universidad Tecnológica de Tecámac.

RESUMEN

La generación de desechos agroindustriales es un problema social, ecológico y económico en territorios de alta concentración poblacional; sin embargo no se presta importancia a estos desechos agroindustriales desaprovechando materias primas con alto potencial energético, que debidamente tratado mediante la biotecnología podrían resolver importantes requerimientos bioenergéticos.

Bacillus subtilis es bacteria Gram positiva, aerobia, generalmente formar endosporas permitiéndole tolerar condiciones ambientalmente extremas. *B. subtilis* se ha convertido en un microorganismo importante con aplicación medioambiental, además de ayudar a la descomposición de residuos vegetales, genera biomoléculas de importancia. En el trabajo se formuló el medio de cultivo partiendo del agua de lavado de arroz (desecho agroindustrial) para utilizarlo como medio de sustento en la fermentación de *B. subtilis*. Aportando la fuente de carbono y fuente de macro y micro elementos, sin apoyo de aireación; se probaron distintas concentraciones de inóculo, se corrieron cinéticas a 25 grados Celsius, obteniendo resultados en la generación de biomasa, se propuso una concentración final 9:1 (Agua de lavado de arroz : inóculo), al cual se comparó con el medio BHI mostrando que el desarrollo de biomasa es equiparable al medio enriquecido, pero con la salvedad de los bajos costos de los residuos agroindustriales.

Lograda la aclimatación se realizaron pruebas para inducir la producción de enzimas proteolíticas, se utilizó medio Agar Sangre y Agar Leche, mediante siembra de diluciones del caldo de fermentación se determinaron halos de hidrólisis. Se evaluó la producción de biosurfactantes en una mezcla de aceite de canola-agua-cultivo, disminuyendo la tensión superficial.

Finalmente para la producción de antibióticos, se utilizó la técnica de sensidiscos, retando el fermento de *B. subtilis* contra hongos como *Fusarium* y *Penicillium*, así mismo contra bacterias Gram negativas, provocando la inhibición de crecimiento de los microorganismos evaluados.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día la producción de metabolitos obtenidos de fuentes biológicas y que resultan de interés industrial han tomado gran importancia a nivel mundial, ya que estos son aplicados en gran variedad de áreas entre las que destacan la industria farmacéutica, textil, alimenticia y agropecuaria. Las ventajas que tienen sobre los productos químicos es que son amigables con el medio ambiente, de un menor costo, esto debido a que se utiliza materia orgánica de desecho industrial como fuente de materia prima para la implementación en un sistema biológico (Aburto, 2008).

Los residuos agroindustriales se diferencian de los desechos en que estos materiales ya no tienen valor comercial y que no pueden ser aprovechados en otros procesos, estos residuos son materiales que todavía pueden ser aprovechados de alguna manera. Se entiende entonces que los residuos agroindustriales son susceptibles de aprovechamiento para generar otros productos de interés. Entre los diferentes usos puede incluir desde sustratos en la fermentación para la producción de metabolitos de interés, hasta compostas, bioenergéticos, suplementos para alimento de animales, entre otros. La composición de los residuos agroindustriales es muy variada, sin embargo debido a su origen vegetal estos compuestos comparten una característica principal, y estas diferencias marcan la elección del residuo a utilizar en función del producto que se requiera (Saval, 2012).

Las fuentes biológicas más utilizadas para la producción de metabolitos son los hongos y bacterias, especies de *Bacillus* pueden producir copiosas cantidades de enzimas que se utilizan en diferentes aplicaciones industriales. Algunas especies pueden formar inclusiones intracelulares de polihidroxialcanoatos bajo ciertas condiciones ambientales adversas, como en la falta de elementos tales como fósforo, nitrógeno u oxígeno combinados con un suministro excesivo de fuentes de carbono (Vega, 2008).

TEORÍA

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, que incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos (Figura 1), formadores de endosporas, quimiheterotrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos, son anaerobios o aerobios facultativos y catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía de 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm . Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en el ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos (Koneman & Allen, 2006)

Una cualidad adicional por la cual son muy estudiadas estas bacterias, es por presentar una potencial capacidad para producir antibióticos, y así, servir como antifúngicos, para proteger a las plantas de enfermedades producidas por hongos (Castillo, 2004). *B. subtilis* es considerado termófilo, por lo que crece hasta 55°C, sin embargo no crece a más de 65°C (Holt, 2000). De igual manera Holt (1984) indicó que *B. subtilis* es psicrofílica a termófila, es decir, que puede crecer en un amplio rango de temperatura y que posee una alta habilidad fisiológica soportando altas salinidades y distintos pH.



Figura 3. Tinción de *Bacillus subtilis* y endosporas

Biotechnología Microbiana

La Microbiología Industrial o Biotechnología Microbiana es el ámbito de la Microbiología orientado a la producción de elementos de interés industrial mediante procesos en los cuales intervenga, en algún paso, un microorganismo. Por ejemplo, la producción de: alimentos (fermentación del vino, pan o cerveza) y suplementos dietéticos (como los cultivos de algas, vitaminas o aminoácidos); biopolímeros, como el xantano, alginato, celulosa, ácido hialurónico, polihidroxialcanoatos, biorremediación de entornos contaminados o tratamiento de desecho. (González, 2012)

Algunas de las aplicaciones de la biotecnología microbiana son en el área farmacéutica, alimentos, enzimas, biorremediación, vacunas, etc. Los microorganismos industriales son especialistas metabólicos capaces de producir de forma específica y con un alto rendimiento de metabolitos particulares. Por otro lado el microorganismo puede ser modificado genéticamente antes de ingresar a la industria; puede ser modificado por mutación o por recombinación. (González, 2012).

Antibióticos

Sustancia química producida por un microorganismo, que desarrolla una actividad antimicrobiana. Su origen puede ser:

- **Natural o biológico.** Se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias.
- **Semisintético:** A partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables

Antimicrobiano Es un término que incluye los compuestos obtenidos de forma natural o biosintética, así como los conseguidos totalmente en el laboratorio. Un agente antimicrobiano debe

cumplir tres condiciones como mínimo: poseer actividad antimicrobiana, desarrollarla a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped.

Los agentes antimicrobianos se comportan de diversas maneras: como bactericidas y como bacteriostáticos. Como bactericidas llegan a producir la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso, a este grupo pertenecen los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas; como bacteriostáticos estos inhiben el crecimiento bacteriano haciendo que el microorganismo permanezca viable, de forma que, cuando se suspenda el tratamiento pueda volver a recuperarse y multiplicarse. (Paredes & Roca, 2004).

Mecanismo de Acción

Es el mecanismo por el cual los antibióticos alteran la biología de los microorganismos, presentándose los siguientes (Paredes & Roca, 2004):

- **Inhibición de la Síntesis de la Pared Celular:** Tiene lugar en diversas fases: β lactámicos, fosfomicina, cicloserina, vancomicina, bacitracina.
- **Desorganización de la Membrana Citoplasmática:** La membrana celular constituye una barrera de permeabilidad y lleva a cabo funciones de transporte activo. Si la integridad funcional de la membrana se altera, los iones y macromoléculas se escapan y la célula se lesiona y muere.
- **Inhibición de la Síntesis de Proteínas:** La síntesis de los ribosomas se realiza en tres etapas: iniciación, elongación, que comprende reconocimiento, transferencia y translocación, y terminación. El ribosoma 70 S, compuesto por dos subunidades, 30 S y 50 S, es la unidad funcional de la síntesis de proteínas en las bacterias, en tanto que los ribosomas de los mamíferos son 80 S y no se dividen en subunidades. Esto explicaría por qué los fármacos antimicrobianos pueden inhibir la síntesis en los ribosomas bacterianos, sin tener efecto sobre los ribosomas de los mamíferos.
- **Interferencia en la Síntesis y/o Metabolismo de los Ácidos Nucleicos:** Existen tres posibles mecanismos por los que los antimicrobianos pueden modificar la síntesis de los ácidos nucleicos: Interfiriendo la replicación del ADN, Impidiendo la transcripción, Inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales.

Enzimas

Son un grupo de proteínas que tienen como función actuar como catalizadores permitiendo que las reacciones que transcurren en los seres vivos puedan desarrollarse a un ritmo adecuado. Un catalizador, por definición, es un compuesto que con su sola presencia aumenta la velocidad de la reacción sin experimentar ninguna modificación. Las enzimas son capaces de acelerar reacciones químicas específicas en un medio acuoso, y en condiciones en las que los catalizadores no biológicos, serían incapaces de realizar iguales funciones. Gran parte de sus propiedades catalíticas radica en el alto grado de especialización que presentan respecto a las sustancias reaccionantes o sustratos. Al igual que las proteínas, les hay de muy diferentes tamaños y requerimientos; algunas necesitan para desarrollar su actividad tan sólo su estructura aminoacídica, mientras que otras requieren la presencia de un cofactor. Este compuesto puede ser, sencillamente un ión inorgánico, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} ; o una molécula orgánica más o menos compleja, que si se encuentra unida covalentemente se denomina grupo prostético, y si establece uniones de naturaleza débil y reversible se denomina coenzima. Muchas vitaminas, o derivados de las mismas, funcionan como coenzimas. La enzima completa junto a su cofactor se denomina holoenzima y su parte exclusivamente proteica apoenzima (Merino & Noriega, 2017).

Dentro de las enzimas que la especie *B. subtilis* produce, se encuentran las proteolíticas, o también conocidas como proteasas, proteinasas o peptidasas, ya que son aquellas que hidrolizan enlaces peptídicos. Las proteasas se distinguen entre las endopeptidasas que actúan en medio de una cadena polipeptídica y las exopeptidasas, que fragmentan aminoácidos sueltos o dipeptidos o tripeptidos situados al final de la cadena. Durante la digestión de los alimentos estas enzimas trabajan mano a mano junto con las aminopeptidasas y las carbopeptidasas, fragmentando en el intestino delgado las proteínas en péptidos, generando aminoácidos libres.

Las proteasas no solo están delimitadas en la digestión de alimentos, también participan en procesos biológicos como la coagulación sanguínea, resistencia inmunitaria, la apoptosis (muerte celular programada) e incluso la replicación viral. (Werner, 2008). Ejemplo de ello son las

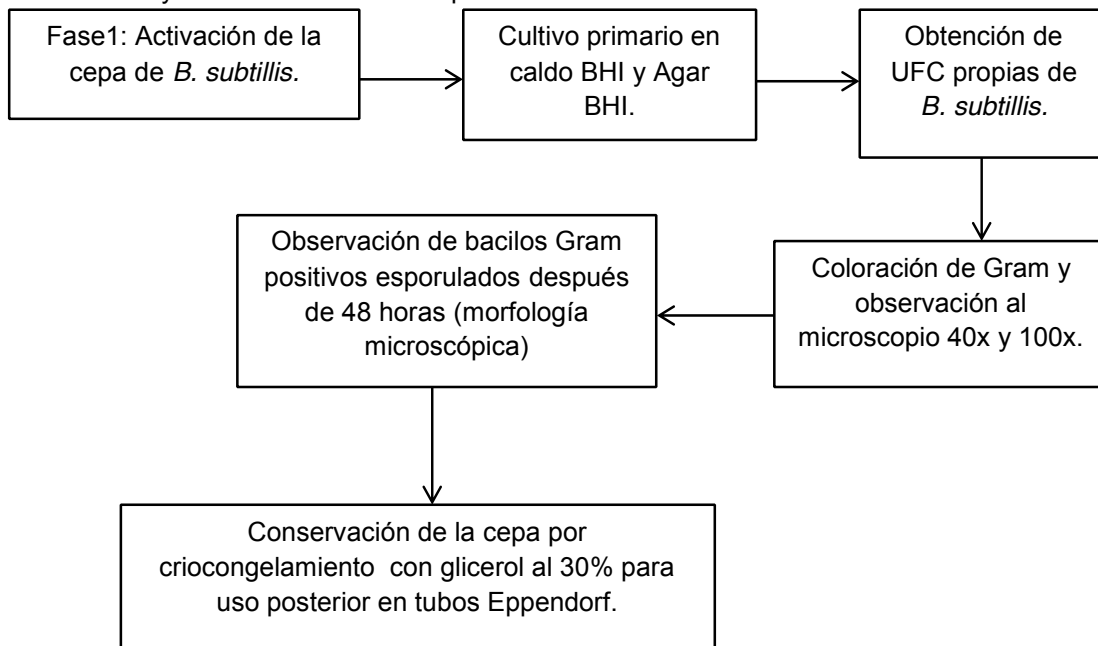
hemolisinas, son enzimas que se encargan de lisar a los eritrocitos, algunos de los microorganismos como *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, entre otros cumplen con esta función. Dentro de la clasificación de las enzimas hemolisinas se encuentran las siguientes (Elmer W. Koneman, 2006).

Biosurfactantes Microbianos

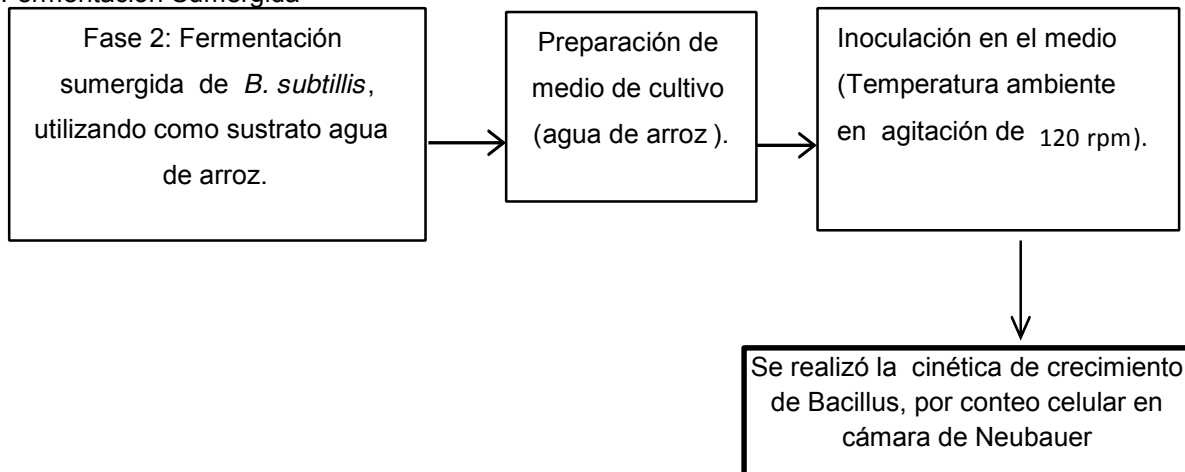
Los biosurfactantes (BS) son compuestos producidos principalmente por hongos y bacterias. Estas moléculas tienen propiedades emulsificantes y dispersantes, disminuyen la tensión superficial del agua de 72 a 25 mN/m aproximadamente. Los microorganismos sintetizan BS cuando la fuente de carbono es parcialmente soluble o insoluble en agua, de esta manera están obligados a sintetizar moléculas con propiedades tensoactivas que favorezcan la biodegradación de los sustratos insolubles. Dentro de los microorganismos productores de biosurfactantes se encuentra *B. subtilis*, que produce un tipo de surfactante lipopeptídico (Ocampo & Wrong, 2013).

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivación y Conservación de la Cepa

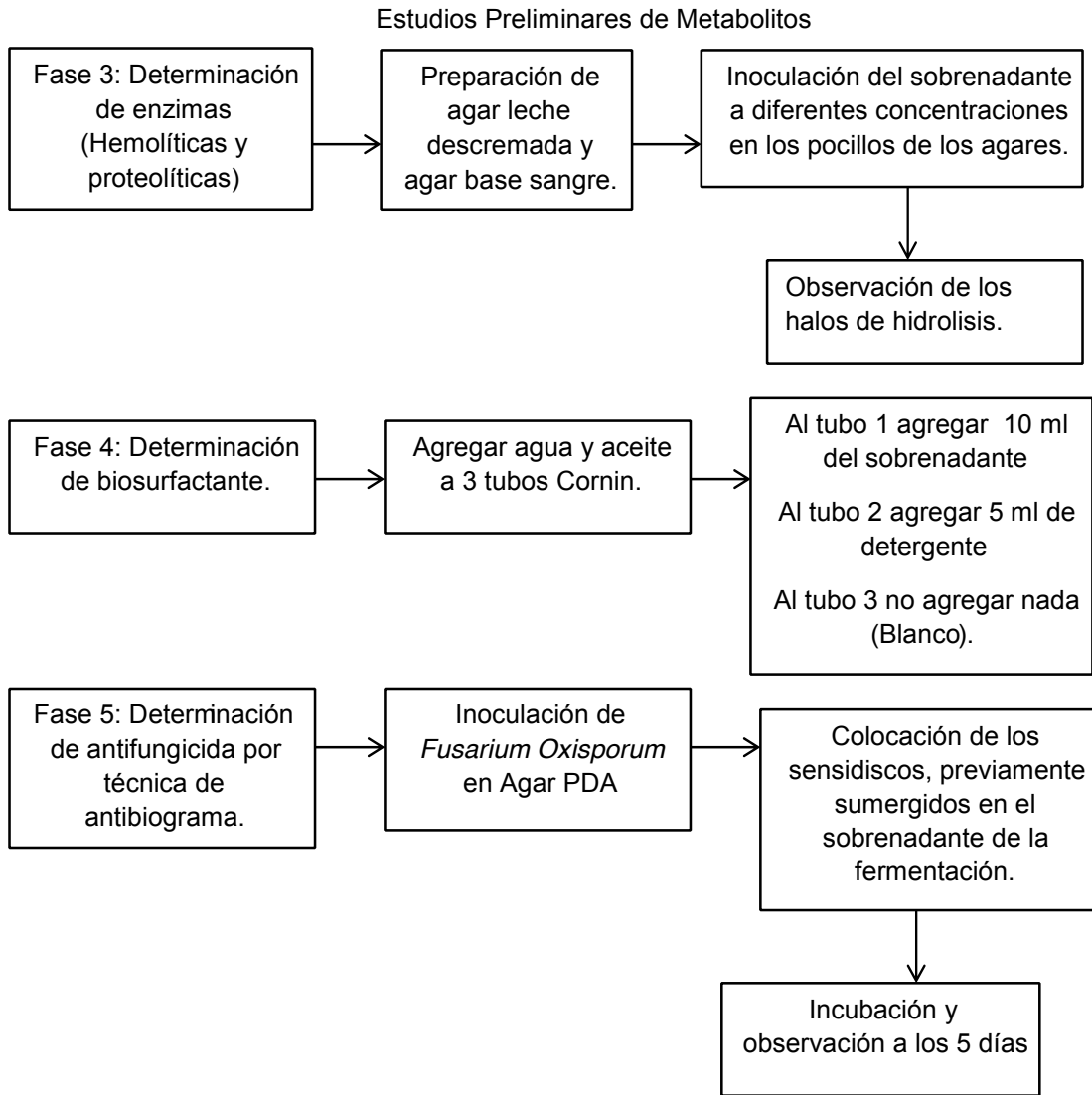


Fermentación Sumergida



Preparación de Agua de Arroz

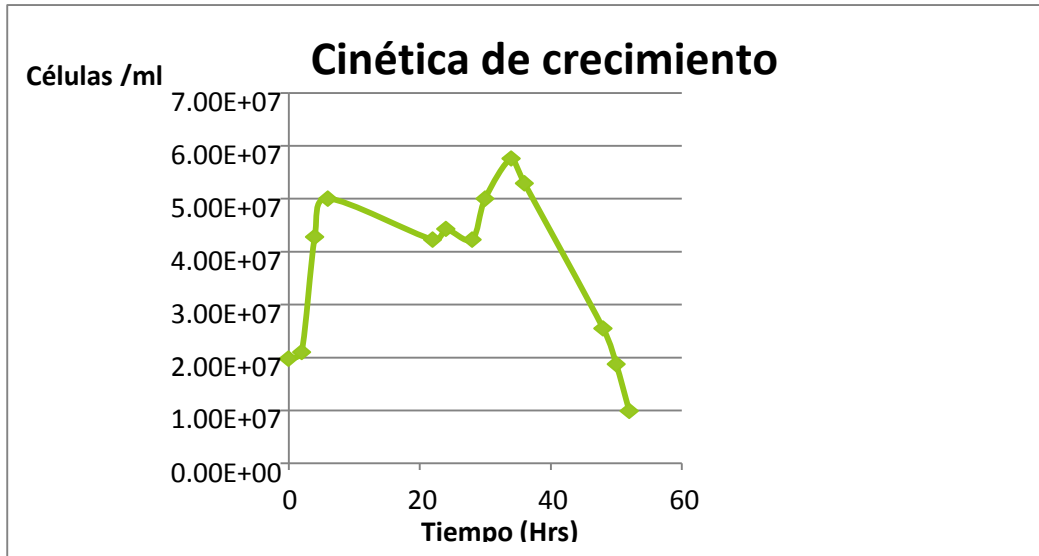
Se utilizaron 300g de arroz y se dejó reposar con 500ml de agua destilada, después se filtró para así poder de retirar el arroz y se prosiguió a esterilizar a 121°C durante 15 minutos.



RESULTADOS

Cinética de Crecimiento

Una vez aislado el microorganismo se llevó a cabo una cinética de crecimiento para analizar cómo se desarrollaba *B. subtilis* a través del tiempo teniendo como sustrato el agua de arroz, para esto se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer durante dos días seguidos.



Producción de Metabolitos

Enzimas

El extracto crudo enzimático presente en el mosto de fermentación fue sometido en el medio Agar Sangre, para la evaluación de la capacidad proteolítica sobre la hemoglobina, a partir de diluciones binarias hasta 1:64 para posteriormente ser depositadas en pocitos formados dentro de la placa de Agar Sangre, obteniendo como resultado a los dos días de incubación un halo de inhibición en la dilución 1:64. (Figura 2)

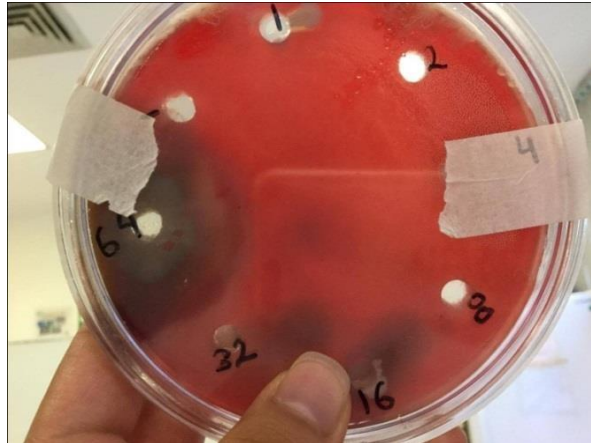


Figura 4. Producción de enzimas hemolíticas en agar sangre

En la producción de enzimas se sometió a *B. subtilis* en estrés para que produjera proteasas, esto a través del medio Luria Bertani, en donde se agregaron 2g de glucosa y 8g de caseína. La glucosa se utilizó como fuente de carbono inmediata por su fácil asimilación y así promover un crecimiento rápido mientras que la caseína es la segunda fuente de carbono, pero de más difícil asimilación por esto es un medio para promover la producción de enzimas que hidrolicen la caseína. Dejando el medio en agitación por 48 horas. Posteriormente se observó la fermentación del mismo.

Para la evaluación de la acción proteolítica del fermento sobre la caseína, a través del medio Agar Leche Descremada se realizaron pozos, en donde se agregaron diluciones binarias del fermento hasta 1:64 para observar si en verdad provoca la hidrólisis de caseína. Cabe señalar, que no solo enzimas proteolíticas produce *B. subtilis* ya que se ha reportado que además produce amilasas.

Producción de Surfactantes

Para determinar la producción de surfactantes se hizo una comparación en dos tubos falcón (Figura 3), agregando a ambos la misma cantidad de aceite de canola y agua, para diferir ambos tubos a uno se le añadió una porción del fermento de *B. subtilis*, y el segundo se utilizaría como blanco observando que el tubo utilizando como blanco al mezclarlas después de unos minutos de reposo se observaba claramente la separación de ambos líquidos, por otra parte en el segundo tubo se observó que entre el agua y el aceite había una mezcla de ambos líquidos por la acción del biosurfactante presente en el mosto de fermentación permite que se observe el fenómeno de emulsificación. De acuerdo con Ocampo & Wrong (2013) en su artículo "Biosurfactantes microbianos Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas" cepas de *B. subtilis* producen biosurfactantes tipo lipopéptido.

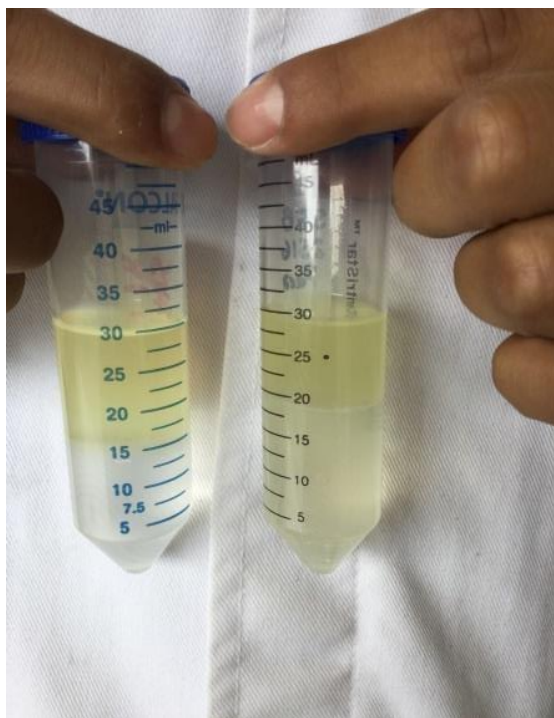
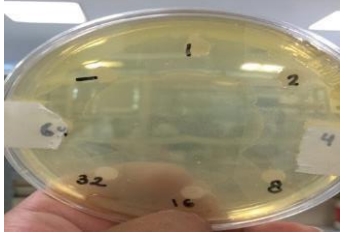
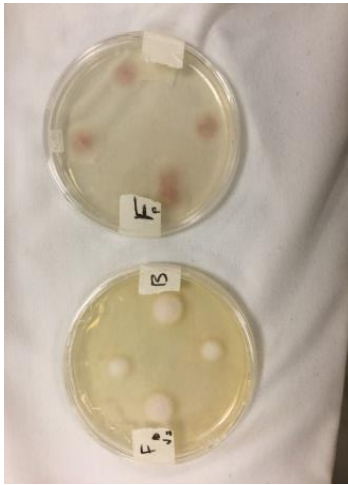
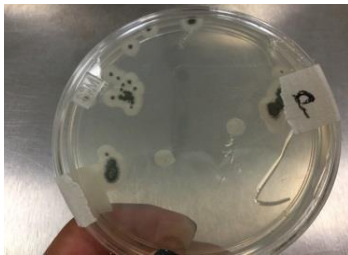


Figura 5. Comparación de tubos falcón para producción de surfactantes

Producción de Antibióticos

Para evaluar el efecto antimicrobiano de *B. subtilis*, a partir de un extracto crudo del mosto de fermentación obtenido utilizando como fuente de carbono agua de arroz, se llevó a cabo la técnica de sensidiscos en placa con Agar para antibióticos inoculado con *E. coli* por vaciado en placa, a partir de diluciones binarias hasta 1:64, así mismo se evaluó su acción antifúngica contra *Fusarium* y *Penicillium*. Madigan y cols. (1999), menciona que *B. subtilis* es productor de antibióticos como Bacitracina y Polimixina. Esta última actúa contra Gram Negativas, como se muestra en la Tabla 1. En cuanto a los hongos, solo se utilizaron dos sensidiscos que fueron sumergidos directamente en el fermento de *B. subtilis*, y de igual forma fueron colocados en el medio.

Tabla 17. Producción de antibióticos evaluado en bacterias y hongos

Nombre microorganismo	Crecimiento	Descripción	Imagen
<i>E. coli</i>	Si	Se muestran halos de inhibición en todas las diluciones presentes en el medio Agar Antibiótico.	
<i>Fusarium</i>	Si	Mediante una comparación en dos cajas con medio se muestra que aquella que tenía al extracto crudo del mosto de fermentación, mostró dificultad en cuanto a características físicas y tiempo de crecimiento.	
<i>Penicillium</i>	Si	Se observó crecimiento normal del hongo, por lo que no se registró acción antifúngica.	

CONCLUSIONES

Al realizar las pruebas para la identificación de proteasas, se observó solo acción sobre hemoglobina pero no sobre caseína registradas hasta la dilución 1:64. Se intentó inducir la producción de otras enzimas proteolíticas para la caseína en un medio con dos fuentes de carbono en caldo L. B, pero el resultado fue el mismo, descartándose la producción de estas.

Se identificó la producción de antibiótico contra *E. coli*, el cual se propone que sea polimixina, ya que esta actúa contra Gram negativas.

Para la determinación antifúngica se observó que el crecimiento de *Fusarium* en presencia del fermento de *Bacillus subtilis* es diferente en comparación de su crecimiento normal, para lo cual se propone realizar pruebas *in vivo* y así observar si verdaderamente actúa en contra de este hongo.

En la determinación de biosurfactante se realizaron pruebas en las que se logró apreciar una actividad emulsificante débil, para lo que se propone realizar la prueba por derrame de gota para complementar la técnica ya propuesta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aburto. (1 de Junio de 2008). *Redalyc*. Recuperado el 30 de Mayo de 2017, de Redalyc: <http://www.redalyc.org/pdf/482/48223104.pdf>
2. Castillo, C., & Sosa, B. y. (2004). Evaluacion de la termoresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporilados del género Bacillus. *Rev. Soc. Ven. Microbiol. Vol. 24, num 1-2*, 65-67.
3. Elmer W. Koneman, S. A. (2006). *Koneman: Diagnóstico Microbiológico*. Madrid: panamericana.
4. González, T. (Junio de 2012). *Semicrobiología*. Obtenido de Presentación del número extraordinario: Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana: <https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/53/p29%2053.pdf>
5. Holt, J., Sneath, P., & Mair, N. &. (2000). Bergey's, manual of Systemic Bacteriology, vol. 2. USA: Williams & Wilkins. Baltimore, MD.
6. K, S., S, B., & R., H. C. (1999). Cellular lysis in Bacillus subtilis; the affect of multiple extracellular protease deficiencias. *Lett. Appl. Microbiol. 29:141-145*.
7. Merino, J., & Noriega, M. (2017). *Open Course Ware*. Obtenido de Fisiología General PDF: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/tema-1.-introduccion-al-estudio-de-la-fisiologia/Tema%20B-Bloque%20I-Enzimas.pdf>
8. Nagórska K, B. M. (2007). Multicellular Behaviour and production of a wide a variety of toxic substances support usage of Bacillus subtilis as a powerful biocontrol agent. No. 3:495508.
9. Ocampo, G., & Wrong, A. (2013). Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos. *BioTecnología*, 13,14,15.
10. Paredes, F., & Roca, J. (Marzo de 2004). *El Sevier*. Obtenido de Acción de los antibióticos. PDF.: www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414-S300
11. Saval, S. (2012). *Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: pasado, presente y futuro*. Recuperado el 29 de Mayo de 2017, de Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: pasado, presente y futuro. http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_2/Saval_Residuosagroindustriales.pdf
12. Vega, E. (Noviembre de 2008). *Universidad de Puerto Rico, Colegio Universitario Humacao Departamento de Biología*. Obtenido de Producción de Alimentos por Actividad Bacteriana (Fermentación). PDF: https://laboratoriomicroaplicada.files.wordpress.com/2008/11/alimentos_fermentados.p df
13. Werner, M. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Barcelona: Reverté.

EVALUACIÓN DE FERTILIDAD DE SUELOS AGRÍCOLAS DE LA REGIÓN CIÉNEGA DE MICHOACÁN

Norma Cristina Rodríguez González, Elizabeth Fernández Rivera, Guadalupe Oyoque Salcedo, Ernesto Oregel Zamudio

Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) IPN Unidad Michoacán.

RESUMEN

En México existe una gran diversidad de suelos debido a la interacción de diversos factores. Michoacán es un estado con un marcado contraste ambiental debido a la confluencia entre dos grandes zonas biogeográficas y una variada topografía diferenciando así diversos tipos de suelos. La región Ciénega de Michoacán está constituida por llanos y sierras volcánicas conformados por sedimentos aluviales y rocas ígneas extrusivas. En los últimos años la región Ciénega de Michoacán han presentado una degradación química de los suelos lo que se traduce como una baja fertilidad debido descenso del pH y, en algunos casos, efectos tóxicos por el aumento en la concentración de algunos elementos, por las actividades industriales y agrícolas (el abuso de pesticidas y fertilizantes), en algunos municipios de la región Ciénega los suelos presentan condiciones de salinidad y sodicidad, que son ambientes desfavorables, para los cultivos, coadyuvando a la contaminación de los recursos. Debido a los antecedentes el presente trabajo determina la fertilidad de suelos de la región Ciénega de Michoacán de acuerdo a las metodologías establecidas en la Norma Oficial Mexicana Nom-021-RECNAT-2000. Como resultados se obtuvo, que los suelos se encuentran neutros a medianamente salinos, el Ca, Mg y K se encontraron en nivel alto y la mayoría presentó adecuada cantidad de micronutrientes, dichos resultados fueron comparados con los valores establecidos en la Norma antes mencionada. Se concluye características de los suelos de la región son variables por los que es de importancia analizar el suelo para que el cultivo obtenga la producción adecuada.

INTRODUCCIÓN

El suelo es una parte fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas; en él se realizan funciones tan importantes como los ciclos biogeoquímicos y la captura de agua. Su formación involucra periodos que pueden llegar a miles de años, pero su degradación, algunas veces irreversible, puede realizarse en periodos considerablemente más cortos. Cuando se habla de la degradación del suelo se hace referencia a los procesos inducidos por las actividades humanas que provocan la disminución de su productividad biológica o de su biodiversidad, así como de la capacidad actual y/o futura para sostener la vida humana (Oldeman, 1998).

El suelo es el medio natural que proporciona a las plantas el sostén físico, además del agua y los elementos nutrientes para su desarrollo. No obstante, con frecuencia estos nutrientes se encuentran en cantidades insuficientes para satisfacer los requerimientos de los cultivos, o bien se encuentran en proporción desbalanceada. Los elementos nutrientes en el suelo se encuentran en tres formas relacionadas con su grado de aprovechabilidad (Havlin et al., 1999).

1. Formando parte de minerales primarios secundarios o complejos orgánicos.
2. 2 Formas aniónicas y catiónicas adsorbidas al complejo coloidal orgánico o mineral del suelo.
3. Formas iónicas o moleculares pequeñas en solución.

Debido a la importancia económica, política y social de la degradación del suelo, tanto en México como en el mundo se han realizado diversos estudios para evaluar la magnitud de la superficie afectada, así como el tipo y grado de afectación. En nuestro país se han realizado diversas evaluaciones, pero debido a diferencias metodológicas y a la escala utilizada, sus resultados no son comparables (Semarnat y UACH, 2003).

En Michoacán la parte este de la ciénega de Chapala; la subprovincia está constituida por llanos y sierras volcánicas conformados por sedimentos aluviales y rocas ígneas extrusivas. Dominan los vertisoles, que en algunos casos presentan problemas de salinidad o sodicidad, y su distribución coincide con los lugares de mayor actividad agropecuaria del Estado, por lo que la vegetación natural se halla muy alterada o eliminada en su mayor parte. En menor proporción se encuentran los

luisoles, los andosoles y los leptosoles. Los municipios de Jiquilpan y Sahuayo están conformados de suelos en las partes bajas de vertisoles regolíticos y suelos arcillosos expandibles como la montmorillonita.

Los suelos de esta región presentan degradación física (66%) por compactación o degradación química por declinación en su fertilidad (53%) (Moncada et al., 2013). La contaminación con metales pesados (Siebe, 1994; Siebe y Cifuentes, 1995), residuos farmacéuticos y bacterias patógenas, son otros problemas que se presentan cuando son irrigados con aguas residuales. Dada la relevancia de estos suelos en la producción de cultivos, en sus implicaciones en la población rural o urbana debido a su degradación y los posibles cambios que pueden sufrir por eventos climáticos, se consideró necesario realizar una revisión con particular énfasis en la fertilidad de los mismos.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestreo para determinar fertilidad de suelos

El muestreo de suelos es un procedimiento para la obtención de una o más muestras representativas en un terreno. El muestreo se realizó con heterogeneidad. Esto conllevó al recolectado de un determinado número de muestras compuestas derivadas de sub-muestras.

Se tomaron seis muestras de suelo en los municipios de Jiquilpan y Sahuayo, Michoacán (cuadro1).

Cuadro1. Identificación de las muestras para su análisis

Lugar de toma de Muestra	Identificación de la Muestra
Municipio de Sahuayo	S1
Municipio de Sahuayo	S2
Municipio de Villamar	S3
Municipio de Cojumatlán	S4
Municipio de Cojumatlán	S5
Municipio de Venustiano Carranza	S6

Metodologías

Para la realización de los análisis para las evaluaciones de clasificación de suelos son consideradas en la NOM-021 SEMARNAT-2000, nombradas a continuación:

AS-01 Preparación de la muestra.

AS-02 pH medido en agua

AS-07 Materia orgánica

AS-09 Determinación de la textura del suelo.

AS-10 Fósforo extraíble en suelos de neutros a alcalinos.

AS-12 Capacidad de intercambio catiónico y cationes intercambiables (calcio, magnesio, sodio y potasio) en suelos neutros.

AS-14 Contenido de micronutrientes disponibles (hierro, manganeso, zinc y cobre).

AS-15 Determinación del contenido de boro.

AS-16 Obtención del extracto de saturación.

AS-18 Medición de la conductividad eléctrica.

RESULTADOS

Como se pueden observar en el cuadro 2 los diferentes resultados de las pruebas realizadas a los distintos suelos de la región Ciénega de Michoacán, los cuales variaciones en algunas determinaciones como son conductividad eléctrica, materia orgánica CIC (capacidad de intercambio catiónico).

Cuadro 2. Datos obtenidos a partir de los análisis establecidos en la NOM 021 SEMARNAT-2000

Muestra	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Determinación						
pH	8.39	6.8	8.5	8.05	8.5	9.09
Conductividad	4.34	5.39	0.287	3.57	1	6.539
Materia Orgánica	3.03	1.83	2.94	1.24	1.24	3.03
Fosforo Aprovechable	13.67	10.85	8.25	9.58	13.2	47.11
CIC	10.78	46.2	59	27.2	28	32.4
Ca	36.71	30.9	21.48	20.04	17.55	29.04
Mg	12.3	18.81	11.23	14.32	9.97	18.41
K	1.8	4.57	0.46	2.34	0.85	8.19
Na	2.36	17.8	0.09	2.61	0.52	42.54
Cu	3.41	1.13	4.99	5.61	4.2	L.D.M.
Mn	10.02	2.76	99.92	18.56	11.71	2.63
Zn	1.1	5.86	0.56	0.63	0.47	L.D.M.
Fe	22.33	2.65	45.52	2.63	3.18	L.D.M.
Boro	0.215	1.99	0.2521	0.4288	0.3533	7.5
Textura:						
Arcilla	87	70	64	40	28	34
Limo	1	18	19	22	32	16
Arena	12	12	17	38	40	50
RAS	0.3636	3.57	0.0223	0.63	0.1402	8.733

De acuerdo a los diferentes criterios que marca la Nom-021-Semarnat-2000, los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 3.

Cuadro. 3 Resultados obtenidos mediante la clasificación establecida en la NOM 021 SEMARNAT-2000

Muestra	Clasificación de acuerdo a la Nom-021-SEMARNAT-2000					
Determinación	S1	S2	S3	S4	S5	S6
pH	Medianamente alcalino	Neutro	Medianamente alcalino Efectos	Medianamente alcalino	Medianamente alcalino Efectos	Fuertemente alcalino Efectos
Conductividad	Salino	Suelo salino	despreciables de la salinidad	Moderadamente salino	despreciables de la salinidad	despreciables de la salinidad
Fosforo Aprovechable	Alto	Medio	Medio	Medio	Alto	Alta
CIC	Baja	Muy Bajo	Muy alta	Alta	Alta	Alta
Ca	Alto	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Mg	Alto	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
K	Alto	Alta	Media	Alta	Alta	Alta
Cu	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Deficiente
Mn	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Adecuado
Zn	Adecuado	Adecuado	Marginal	Marginal	Deficiente	Deficiente
Fe	Adecuado	Marginal	Adecuado	Marginal	Marginal	Deficiente
Boro	Muy bajo	Alto	Muy Bajo	Bajo	Muy Bajo	Muy alto

CONCLUSIONES

El presente trabajo concluyo que a pesar de no ser tan grande la extensión de la Región Ciénega de Michoacán sus suelos son muy diferentes por lo cual hay una heterogeneidad alta. Lo anterior puede atribuirse a los factores externos tales como: la aplicación de diferentes agroquímicos, y así como el manejo de distintos cultivos.

Sin embargo la zona en general presenta suelos con gran potencial si son tratados adecuadamente. Es importante tener un estudio sobre el análisis de fertilidad de suelo ya que esto nos dará parámetros para poder actuar sobre nuestros suelos y así aprovechar el máximo de rendimientos de nuestros cultivos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional, por las facilidades otorgadas para la elaboración de este trabajo en las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) IPN Unidad Michoacán.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coulombe, C. E., L. P. Wilding, and J. B. Dixon. 2000. Vertisols. In: M. E. Sumner (ed.). Handbook of Soil Science. CRC Press. New York, NY, USA. pp. 269-286
2. Havlin, J.I., J.D. Beaton., S.L. Tisdale and W. Nelson. 1999 Soil Fertility and fertilizers 6ª Edición. Prentice Hall. 499 p.
3. ISRIC (International Soil Reference and Information Centre). 2013. The Vertisols. Disponible en www.isric.org/isric/webdocs/docs/major_soils_of_the_world/set3/vr/vertisol.pdf.
- 4.- Moncada de la Fuente, J., M. Anaya Garduño, C. Ortiz Solorio, P. Sánchez García y J. Chacón Rodríguez. 2013. Folleto técnico. Suelo: Protejamos el suelo que nos da vida. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México
- 5 Norma Oficial Mexicana NOM-021 RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
6. Oldeman, L.R. (1998) Guidelines for general assessment of the status of human-induced soil degradation. Working paper 88/4. International Soil Reference and Information Centre (ISRIC). Wageningen.
7. Semarnat y UACH.(2003). *Evaluación de la pérdida de suelos por erosión hídrica y eólica en la República Mexicana, escala 1: 1 000 000. Memoria 2001-2002.* México.

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE GLUCOSA, ETANOL Y ACETATO DE UNA BEBIDA ARTESANAL OBTENIDA DE LA PLANTA *COCOS NUCIFERA* L.

Analine Luciano Morales ¹, Angélica Ramírez Castro ¹, Fernando Astudillo Melgar ¹, Daysi Návez González ², Gerardo Huerta Beristáin ¹

¹ Unidad de Investigación en Biotecnología de Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Guerrero. México. ²Unidad de Investigación Especializada en Microbiología – UAGro. Av. Las Colinas S/N. Petaquillas, Guerrero. México.
Email.: hbgerardo@gmail.com

RESUMEN

Introducción: A partir de la savia extraída de *Cocos nucifera* L., se obtiene una bebida fermentada conocida como Tuba. Sin embargo, no se conoce la composición fisicoquímica y metabólica obtenida durante la fermentación de la savia, la caracterización de esta bebida artesanal puede contribuir a generar procesos de producción reproducibles, conservando la composición nutricional para los consumidores. Metodología: La muestra de savia de *Cocos nucifera* L., fue obtenida con los productores de Las pozas, municipio de Acapulco. Guerrero. Estas muestras fueron fermentadas bajo condiciones controladas en el laboratorio, a 30°C y 150 rpm. Para las diferentes determinaciones se tomaron muestras a las 0, 6, 12 y 24 h de fermentación. La determinación de azúcares reductores se realizó por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, la determinación de humedad, biomasa y cenizas por el método de pérdida de peso (NMX-F-294-SCFI-2011 y NMX-F-284-SCFI-2011). La concentración de glucosa, etanol y acetato por HPLC. Resultados: La Tuba contiene 68.86 g/L de azúcares reductores al inicio de la fermentación y esta concentración disminuye a las 24 h, además el contenido de proteínas se mantiene de (0.024 a 0.040 g/L) en sobrenadante y en pellet de (16.61 a 45.42 g/L). El porcentaje de humedad con respecto al tiempo de fermentación aumentó de 93.5% a 97.6%, efecto contrario se observó con la biomasa y contenido de cenizas (0.065-0.024 mg/ml y 0.004-0.001 mg/ml, respectivamente). La concentración de glucosa, etanol y acetato fueron 24.5, 1.1 y 0.6 g/L al inicio de la fermentación y de 1.3 g/L, 32.0 g/L y 5.3 g/L al final de la fermentación. Conclusión: La Tuba puede ser considerada como alimento apto para consumo humano durante las primeras 12 horas y después de las 24 horas como bebida alcohólica.

INTRODUCCIÓN

En el Estado de Guerrero, existe una gran diversidad de bebidas fermentadas obtenidas por diferentes procesos y con distintas materias primas, muchas de ellas de importancia tradicional, industrial y económica. A partir de *Cocos nucifera* L., se obtiene una bebida fermentada conocida como tuba. Ésta fue introducida a México a través de los viajes de la Nao y actualmente los estados que la producen son Guerrero, Colima, Michoacán y Jalisco. Sin embargo, las características fisicoquímicas de la bebida en los diferentes estados no se conocen y esto es necesario para generar procesos de producción que sean reproducibles, con el fin de obtener Tuba con las mismas características fisicoquímicas y nutricionales atractivas para los consumidores.

TEORÍA

El cocotero (*Cocos nucifera* L.), es una especie de palmera de la familia Arecaceae, es monotípica, presentan tallos de hasta 20 metros de alto y hojas pinnadas. La inflorescencia es interfoliar; las flores son unisexuales y el fruto uniseminado (Guevara y Jáuregui, 2008). El origen y domesticación del coco es desconocido, sin embargo, se han planteado algunas teorías, como la de Harries en 1978, quien señaló su posible origen en la región Pacífico-Asiática, mientras que Gunn en el 2004 indicó su origen en América del Sur. Pocas plantas tienen aplicaciones tan variadas como el cocotero; por ejemplo: el mesocarpio, se emplea en la fabricación de fibras textiles y aislantes térmicos; el endocarpio, se utiliza como combustible en forma de carbón, y como vasija o recipiente. El agua de coco es una bebida agradable y refrescante. El endospermo o pulpa puede comerse directamente o bien a partir de ellos se obtiene aceite y copra. Las hojas y troncos son empleados como materiales de construcción y combustibles; las hojas se usan para techos, cestería y

sombreros; los pecíolos y nervaduras sirven para cercos, bastones y escobas. El aceite de coco, es empleado en la industria de oleoquímicos, en donde las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas de los ácidos grasos y sus derivados son usados en la fabricación de una gran variedad de productos tales como: surfactantes y espumas estabilizadoras para detergentes o shampoos. De las inflorescencias se obtiene un jugo o ponche, bebida refrescante muy dulce que contiene un 16 % de sacarosa. De ella se obtiene azúcar de palma o bien se hace fermentar para elaborar aguardiente, vino de palma (“tuba”), “arrak” o vinagre (Granados y López, 2002).

Tuba.

La tuba es una bebida que se obtiene por medio de la fermentación de la savia de las inflorescencias de la palma. Es consumida en zonas tropicales de varias partes del mundo. Ésta, a diferencia de muchas bebidas tradicionales de México, no tiene un origen prehispánico ya que su forma de preparación proviene de las Filipinas y fue introducida a México por medio de los españoles durante los viajes de la Nao de China también llamada Galeón Manila, en el siglo XVI. Desde su llegada a México la Tuba representa una actividad económica y forma parte de las tradiciones nacionales. El proceso de producción de la Tuba se lleva a cabo a partir de las inflorescencias tiernas (45 a 75 cm de largo), la operación inicial consiste en cortar el extremo de la espata y doblar el eje para que la Tuba fluya libremente de la incisión o corte hacia el lugar de colecta sin romper el racimo floral. Normalmente se colectan de 2 a 5 litros por palma cada 12 horas (Granados y López, 2002). En México la Tuba se extrae sólo en las costas de Colima, Michoacán, Guerrero y Jalisco. En este último existen 300,000 cocoteros destinados a la obtención de la Tuba o vino de palma (Granados y López, 2002).

Debido a sus características de color, viscosidad, olor y sabor, la Tuba se considera una bebida similar al pulque y, al igual que éste, puede ser preparada con diversos vegetales y frutas. La savia de la palma recién obtenida es de color pardo, la cual se clarifica durante el proceso de fermentación, adquiriendo un color blanco. La Tuba también se consume en países de África como Ghana y Sudáfrica donde se conoce como “legmi”, en Filipinas, Malasia y la India donde se le conoce como “kallu” y en Borneo tiene los nombres de “bahar” y “goribon” (Velázquez *et al.*, 2011). En diferentes partes del mundo existen bebidas similares a la Tuba, conocidas como *palm wine* obtenidas de la savia de diferentes palmeras (20 especies de palma distribuidas en diferentes partes del mundo). Estudios sobre la microbiología del palm wine de África revelan la presencia de diversas levaduras principalmente del género *Saccharomyces*, bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y ácido acéticas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* lo cual indica que la fermentación se lleva a cabo por múltiples microorganismos (Amoa-Awua *et al.*, 2006; Stringini *et al.*, 2009).

PARTE EXPERIMENTAL

Adquisición de la muestra.

La adquisición de la muestra fue en Acapulco de Juárez, Guerrero, México, ubicado a una latitud de 16°46'49.43" N y una longitud de 99°47'03.56" O a 11 msnm, en el mes de junio del 2016, la muestra se transportó en frío al Laboratorio de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en la ciudad de Chilpancingo, Gro. para su procesamiento.

Fermentación de la Tuba.

La fermentación de la Tuba se realizó en 4 matraces de 250 mL, con 50 mL cada uno. Para el proceso de fermentación, los matraces fueron incubados a 30°C y 150 rpm. Para el análisis fisicoquímico y metabólico se tomaron muestras de 15 mL a las 0, 6, 12 y 24 horas de cultivo. Cada muestra fue fraccionada (15 mL de tuba completa, 15 mL de sobrenadantes y 1 paquete celular obtenido de 15 mL de tuba completa) para los diferentes análisis posteriores y guardada a -20°C.

Análisis de Humedad y Biomasa.

Se consideró una muestra de 2 mL de la Tuba en los diferentes tiempos de fermentación utilizando la Tuba completa, la cual se le agregó una vez que los crisoles estuvieran en peso constante a una temperatura de 105°C, obteniendo el peso constante se procedió a pesar las muestras, sacando los cálculos se determinó la humedad, al igual que la biomasa, se realizaron por duplicado. Por el método de pérdida de peso regido por la (NMX-F-294-SCFI-2011).

Determinación de Cenizas.

Para la técnica de ceniza se usaron 4 crisoles de porcelana los cuales se colocaron dentro de una mufla por un día completo para que llegara a peso constante a una temperatura de 105°C. Después

se colocaron 2 mL de muestra hasta llegar a peso seco. El crisol que contiene el residuo, se colocó en la mufla a una temperatura de 105°C y se programó para que llegue a 350°C, manteniendo a esta temperatura por 4 horas hasta obtener ceniza, se trasladan en un desecador para saber el peso de la muestra, se hizo por duplicado. Por la y (NMX-F-284-SCFI-2011) con ayuda de una estufa de secado y balanza analítica.

Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas se realizó en muestras de sobrenadantes y paquete celular obtenido de la Tuba fermentada. La preparación de los extractos para la determinación de proteínas se realizó colocando 5 gotas de cloroformo al paquete celular se sometió a agitación con vortex por 5 minutos, se dejó evaporar el cloroformo y finalmente se le agregó 1 mL de buffer de Tris. La determinación de proteínas en los sobrenadantes se realizó directo del sobrenadante obtenido de la Tuba. La determinación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford García y Vázquez (1998).

Determinación de azúcares reductores.

La determinación se realizó por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), en los 4 tiempos colectados de fermentación.

Determinación de metabolitos de fermentación

Para las determinaciones de glucosa, etanol y ácidos orgánicos por HPLC se utilizó una columna Aminex HPX-87H y H₂SO₄ 5 mM como fase móvil (0.5 ml/min) a 50°C, (modelo U6K, Waters, Millipore Co., Milford, MA). La determinación por HPLC, se llevó a cabo por cromatografía isocrática con H₂SO₄ 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min en una columna Aminex HPX-87H (Biorad) a 50°C. La detección de los compuestos separados, se llevó a cabo simultáneamente con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). El análisis y procesamiento de datos se realizó con el sistema Milenium (Versión 3.01 Waters). Las temperaturas interna y externa de la columna fueron ajustadas a 45 y 50°C respectivamente. Los sobrenadantes de las muestras a analizar se filtraron con membranas de 0.45 µm y se inyectaron automáticamente. Para la confirmación del azúcar y los metabolitos analizados por HPLC se inyectaron estándares de glucosa, ácidos orgánicos y etanol.

RESULTADOS

Durante la fermentación de la tuba en condiciones *in vitro* se observaron los siguientes cambios físicos durante los diferentes tiempos de fermentativos: La textura se volvió viscosa conforme transcurre el proceso, además presenta un color pardo al inicio del desarrollo bioquímico lo cual se va tornando a un tono blanco. La presencia de espuma al inicio del procedimiento catabólico no se observó y conforme transcurre la fermentación esta va incrementando, por la generación de CO₂ como co-producto del etanol generado por el metabolismo de los azúcares presentes en la tuba de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.). Además la espuma se incrementa a partir del tiempo 6 hasta el tiempo 24, como se observa en la siguiente figura, además, el pH fue de 3.4 durante todo el análisis.

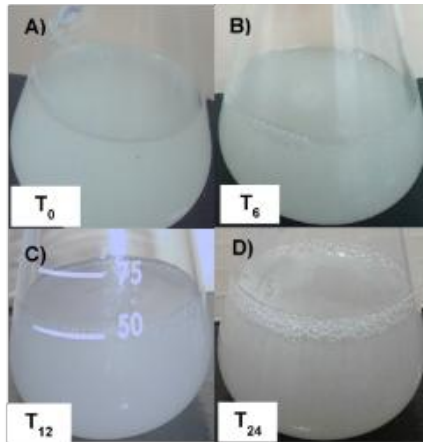


Figura 1. Fermentación *in vitro* de las muestras de tuba a diferentes tiempos de fermentación. A) 0 horas B) 6 horas, C) 12 horas y D) 24 horas de fermentación.

Humedad, Biomasa y Ceniza.

El porcentaje de humedad aumentó ligeramente a las 12 horas del cultivo (93.30%) en comparación a la humedad observada a las 6 horas (92.22%), el porcentaje de humedad fue mayor a las 24 horas (Figura 2A).

En cuanto a la generación de biomasa celular se tiene un punto de biomasa máxima a las 6 horas de fermentación (0.079 mg/mL) y después este parámetro disminuye conforme transcurre la fermentación (Figura 2B). El contenido de cenizas, es la misma concentración (0.002 mg/mL) hasta la 12 horas de fermentación y posterior a este tiempo empiezan a disminuir (0.001 mg/mL).

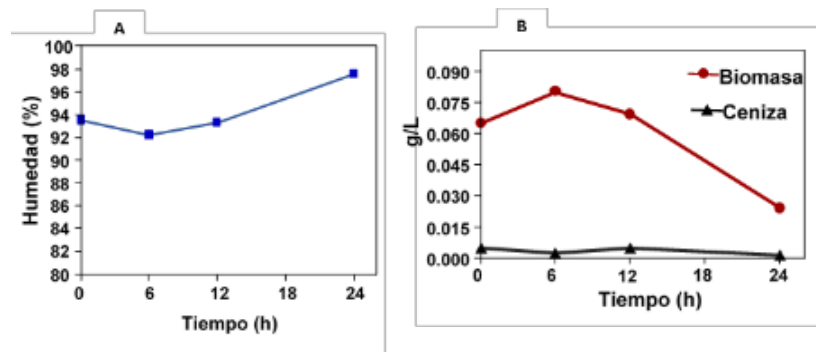


Figura 2. Análisis de humedad y cenizas. A) Porcentaje de humedad, B) Determinación de biomasa y ceniza. Ambas pruebas fueron realizadas durante el transcurso de la fermentación.

Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas intracelulares incrementó a partir de las 6 h de cultivo, estas incrementan conforme transcurre la fermentación y se relaciona con el aumento de las poblaciones microbianas que se están desarrollando en la tuba (Figura 3).

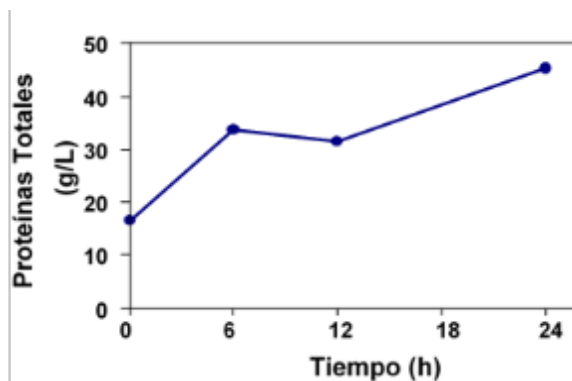


Figura 3. Concentración de proteínas intracelulares. Cuantificación realizada en los 4 tiempos de fermentación analizados.

En el contenido de proteínas extracelulares, a partir del T₁₂ se observó un aumento de concentración de 0.040 g/L, y conforme transcurre el tiempo de fermentación. El contenido de proteínas extracelulares es menor al observado en las proteínas intracelulares, cabe mencionar que la proteína soluble presente puede ser debido al rompimiento de células o la síntesis de péptidos bioactivos por algún microorganismo presente en la Tuba, (Figura 4).

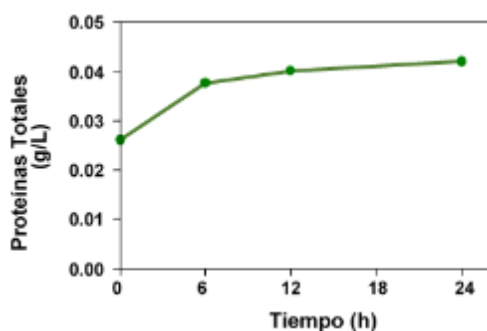


Figura 4. Concentración de proteínas extracelulares. Cuantificación realizada en los 4 tiempos de fermentación analizados.

Determinación de azúcares reductores.

Para la determinación de azúcares reductores se realizó una curva estándar. A las 6 horas del proceso fermentativo se observa un incremento en la concentración de los azúcares reductores (92.50 g/L), y posteriormente disminuye con forme transcurría el tiempo de fermentación llegando a valores de 84.2 g/L a las 12 h y 25.0 g/L a las 24h. (Figura 5)

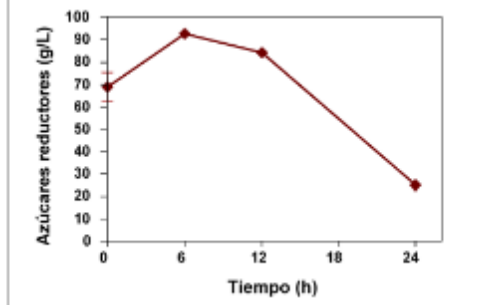


Figura 5. Concentración de azúcares reductores a través del tiempo de fermentación.

Determinación de glucosa, etanol y acetato en sobrenadantes de la tuba.

En la Figura 6 se muestran las cinéticas de consumo de glucosa y de formación de etanol y acetato, donde se observa una máxima concentración de glucosa (27.8 g/L) a las 6 horas y esta va disminuyendo conforme transcurrió del tiempo de fermentación; así mismo se observa que a partir de las 12 horas de fermentación se observó la acumulación de etanol y de acetato lo cual va incrementando conforme transcurre el proceso de fermentación.

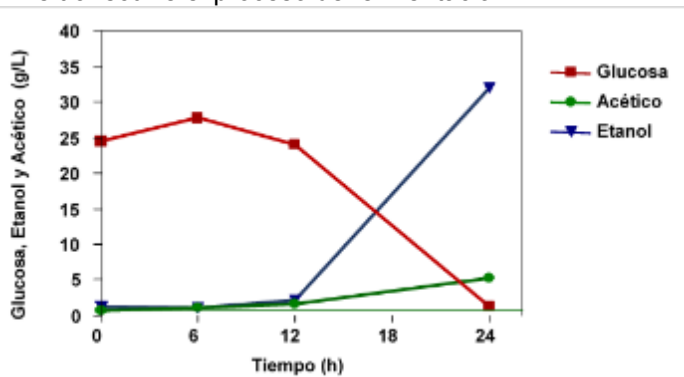


Figura 6. Concentración de Glucosa, Etanol y Acetato en los 4 tiempos de fermentación.

CONCLUSIONES

En la Tuba guerrerense la humedad aumenta con respecto al tiempo de fermentación y el contenido de cenizas y biomasa celular disminuyen. El contenido azúcares reductores disminuyó de 68.86 a 25.00 g/L, sin embargo la cantidad de proteínas incrementa tanto en sobrenadante como en el paquete celular. Las concentraciones de glucosa, etanol y acetato en la Tuba antes de las 12 horas de fermentación fue de alrededor de 27.8, 1.5 y 2.1 g/L respetivamente, y después de las doce horas, la concentración de glucosa disminuyo a 1.3 g/L y la de etanol y de acetato aumenta a 32.0 y 5.3 g/L, respectivamente. Por lo tanto, se determinó que la Tuba puede ser considerada un alimento apto para consumo humano durante las primeras 12 horas y después de este tiempo sería considerado una bebida alcohólica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amoah-Awua W., Sampson E., Tano-Debrah K. (2006). Growth of yeast, lactic and acetic bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *Journal of applied microbiology*. Vol. 102, 599-606.
2. Granados, S., y López, R. (2002). Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México, *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 8(1): 39-48, 2002.
3. Gunn, B. (2004). The phylogeny of the cocoeae (*Arecaceae*) with emprasis of *Cocos nucifera* L. *Ann. Missouri Bot. Gard.* Vol. 91:505-522.
4. Harries, H. (1978). The evolution dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *The botanical review*, vol. 44: pag. 265-320.
5. Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., y Ciani, M. (2009) Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon, *Food Microbiology*, vol.26, Issue 4, pag. 415–420
6. Velázquez, J., Meléndez, N., Rodríguez, R., y Aguilar, C. (2011). Tuba: una bebida fermentada tradicional de Colima. *Facultad de ciencias químicas Universidad Autónoma de Coahuila, ciencia cierta*, No.25.

ACTIVIDAD ALELOPÁTICA DE HELIETTA PARVIFOLIA L., KARWINSKIA HUMBOLDTIANA L. Y LARREA TRIDENTATA L. EN CHILE MORRÓN (CAPSICUM ANNUUM L.)

Sergio Moreno Limón*; Sergio Manual Salcedo Martínez, Jorge Alberto Villarreal Garza

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
Apartado Postal F 16. San Nicolás de los Garza, N.L. Tel. (81) 8352-1142.
sergio.morenoilm@uanl.edu.mx

RESUMEN

Los metabolitos secundarios de plantas juegan un papel vital en las interacciones entre organismos en los ecosistemas. Estas sustancias se conocen como aleloquímicos y el fenómeno se designa aleloquimia o alelopatía cuando se establece entre individuos vegetales. El chile es uno de los cultivos más importantes en México, sin embargo, en algunas regiones su producción enfrenta problemas de establecimiento debido a las características intrínsecas de la semilla y el desarrollo de la planta. Esta investigación tiene el propósito de buscar alternativas naturales con potencial herbicida y/o fitoregulador, utilizando tres especies vegetales: barreta (*Helietta parvifolia* L.), coyotillo (*Karwinskia humboldtiana* L.) y gobernadora (*Larrea tridentata* L.), presentes en zonas áridas de Nuevo León. Las semillas y plántulas de chile fueron tratadas con los extractos a cuatro concentraciones (1, 3, 5 y 10%) y tres tiempos de inmersión (6, 12 y 24 h). Los resultados mostraron que los extractos de las tres especies, coyotillo, gobernadora y barreta, ocasionaron una disminución en los porcentajes germinativos y de crecimiento respecto a los controles indicando su potencial uso como herbicidas naturales.

Palabras Clave: Alelopatía, Extractos de plantas, gobernadora, coyotillo, barreta.

INTRODUCCIÓN

El chile es uno de los cultivos más importantes y de mayor demanda en México por los múltiples usos de sus frutos, desde condimento o “especia” hasta como materia prima para la obtención de colorantes y oleorresinas con fines industriales. Este también representa una buena fuente dietética de antioxidantes como flavonoides, compuestos fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico, vitamina A y los propios capsicinoides (Matsufuji *et al.*, 1998; Osuna-García *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 2000). En México, el 40% de la producción agrícola de chile la desarrollan los agroindustriales y entre un 60 y 70% los agricultores rurales. Los agroquímicos han permitido incrementar notablemente los rendimientos y rentabilidad de los cultivos, pero su uso constante puede alterar el medio biológico del suelo y encarecer la producción agrícola. Debido a esto, resulta de gran importancia investigar y desarrollar estrategias sustentables que permitan una agricultura menos contaminante, basada en recursos naturales renovables. Existen controladores alelopáticos que pueden inhibir el crecimiento de malezas de una forma más ecológica, o bien, que tienen el potencial de incrementar significativamente la producción de algunos cultivos de importancia económica. En las zonas áridas existen recursos subutilizados, cuya importancia se incrementa al descubrir propiedades y aplicaciones diferentes a las tradicionales. Tal es el caso de especies como *Helietta parvifolia* L., *Karwinskia humboldtiana* L. y *Larrea tridentata* L. en las que se reportan efectos fungicidas, herbicidas, alelopáticos y fitoreguladores. Graue (1981) refiere el efecto inhibitorio de los extractos acuosos de *H. parvifolia* al evaluarlo en diferentes especies. Así mismo, Lozano (1992) reporta que los efectos alelopáticos fueron favorables con la utilización de agua de arrastre de *H. parvifolia* sobre los componentes del rendimiento del frijol, el efecto se manifiesta en el incremento de la asimilación de CO₂ a 600ppm. Gámez *et al.* (2007) mencionan que si bien los extractos de *L. tridentata* y *K. humboldtiana* al 5% actúan como inhibidores de la germinación en sandía, melón y calabaza, en el caso del tomatillo estos resultaron tener un efecto estimulante. Por otra parte, Lira-Saldivar *et al.* (2008) reportan que los extractos resinosos de *L. tridentata* tienen un efecto bioestimulante en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de frijol, maíz, lechuga y brócoli. Gámez-González *et al.* (2008) señalan que los extractos de *H. parvifolia* presentan un gran potencial de aplicación herbicida, mientras que los de *K. humboldtiana* y *L. tridentata* estimulan la germinación y crecimiento temprano de diferentes genotipos de sorgo. El tener conocimiento sobre estos efectos debe conducirnos hacia la búsqueda de mayor información que nos permita aprovechar

dicho potencial para el beneficio humano y el establecimiento de metas más ecológicas para la agricultura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. El germoplasma de “chile morrón” fue adquirido en una casa comercializadora de semillas. Las muestras vegetales de *Helietta parvifolia*, *Karwinskia humboldtiana* y *Larrea tridentata*, fueron colectadas en el ejido Mina, ubicado en Mina, Nuevo León. El material se secó a temperatura ambiente, se defolió y posteriormente se limpió y desinfectó mediante inmersión en solución de cloro al 10% v/v durante 20 min. Luego se secó en una estufa de convección durante tres días a 35°C, se molió en una licuadora y el polvo se almacenó hasta su posterior uso.

Preparación de Extractos. Los extractos se prepararon pesando 2.5, 7.5, 12.5 y 25.0g de polvo. Se dejaron reposar en 250mL de alcohol etílico durante una semana a temperatura ambiente. Los recipientes fueron envueltos en papel aluminio para evitar deterioro por luz. Transcurrido ese tiempo los extractos se agitaron durante 24 h y se filtraron tres veces con papel filtro. Se colocaron en una estufa para evaporar el 75% del volumen y se aforaron con agua destilada al volumen inicial (250mL). Así, se obtuvieron soluciones en concentraciones de 1%, 3%, 5% y 10%.

Evaluación in vitro de la actividad alelopática en la germinación. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 42 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Se separaron 900 semillas y se distribuyeron en 12 viales de 50mL, en los que se aplicaron 5mL de cada extracto, en sus diferentes concentraciones, y se dejaron reposando durante 6 horas. Transcurrido el tiempo, las semillas de cada vial se distribuyeron en tres cajas petri con papel filtro y se les agregaron 10mL de agua destilada. Se incubaron a 27°C revisando diariamente para mantener la humedad. Posteriormente, a los 14 días se evaluó el porcentaje de germinación. Este procedimiento se repitió en 12 y 24 h de inmersión de las semillas en cada tratamiento. Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (Olivares, 1994).

Evaluación de la actividad alelopática en el crecimiento de plántulas

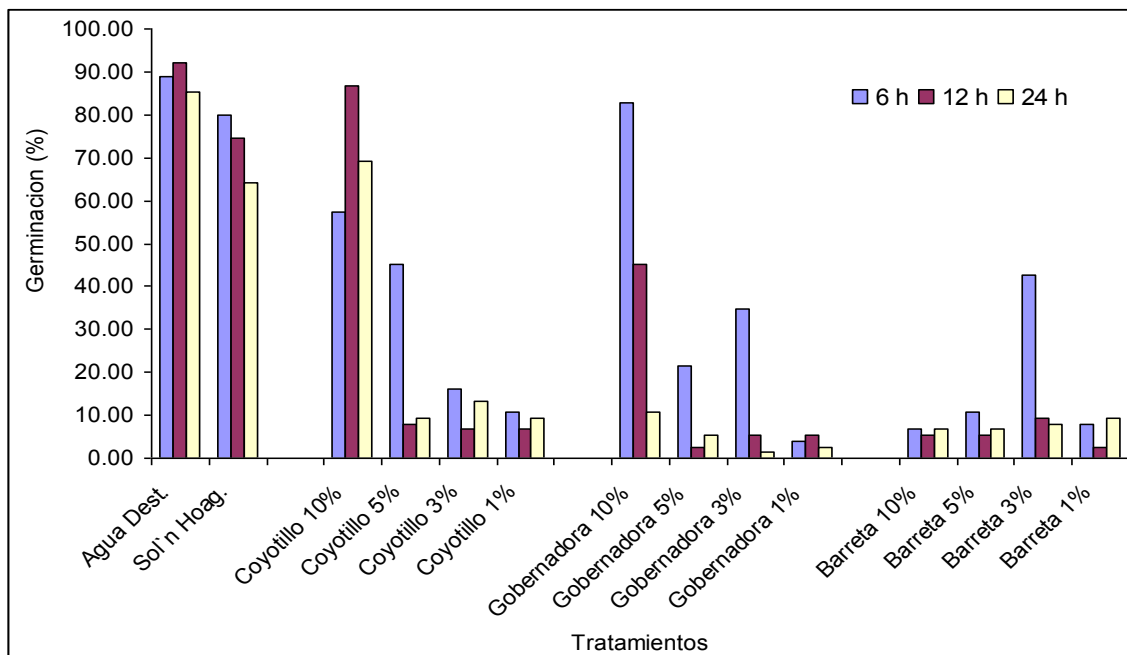
Trasplante de plántulas de chile. Plántulas de 45 días fueron trasplantadas a macetas individuales y se las colocó en una cámara bioclimática durante dos semanas, controlando factores ambientales como luz y temperatura para dar lugar a su aclimatación.

Aplicación del tratamiento. Se separaron dos lotes de 18 plántulas y se aplicaron por triplicado los tratamientos. La aplicación se realizó de dos formas, al primer lote se le aplicó tratamiento mediante aspersión en el área foliar y al segundo se le aplicaron 10ml de extracto directamente al sustrato. Las aplicaciones se realizaron semanalmente. Durante este tiempo se evaluaron los efectos de los extractos sobre la longitud de la plántula, número de hojas, así como la presencia de clorosis o marchites. Para determinar el efecto causado por cada sustrato al final del bioensayo se determinó la longitud de tallo y el número de hojas. El control consistió de 3 plántulas a las que únicamente se les agregó agua destilada.

Extracción de clorofila. Esta se llevó a cabo con acetona al 80%, utilizando 0.01g de muestra por tratamiento, tomando esta cantidad de las hojas de la plántula, macerando y colocando en matraz de aforación de 10mL aforando hasta el volumen final. Se realizaron las lecturas a 663 y 648nm para la determinación de clorofila a, clorofila b y clorofila total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

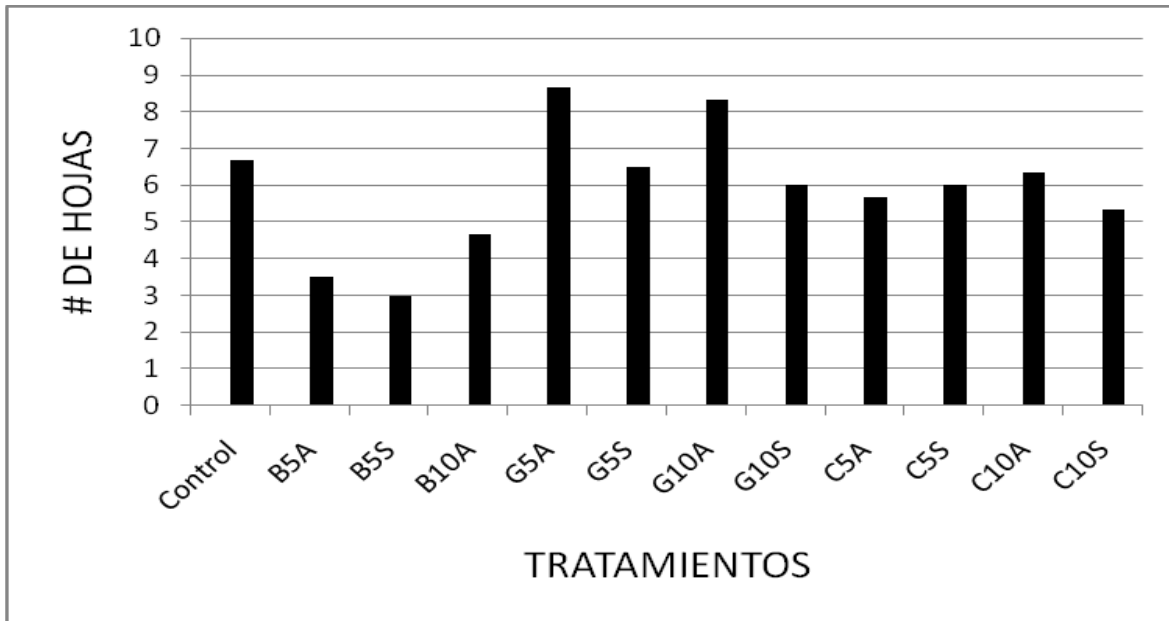
Los resultados obtenidos a través del análisis de varianza demostraron que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) y que los tratamientos con extractos de las tres especies, coyotillo, gobernadora y barreta, en diferentes concentraciones y durante diferentes tiempos, produjeron, de manera general, una disminución en los porcentajes de germinación con respecto a los controles (Grafica 1).



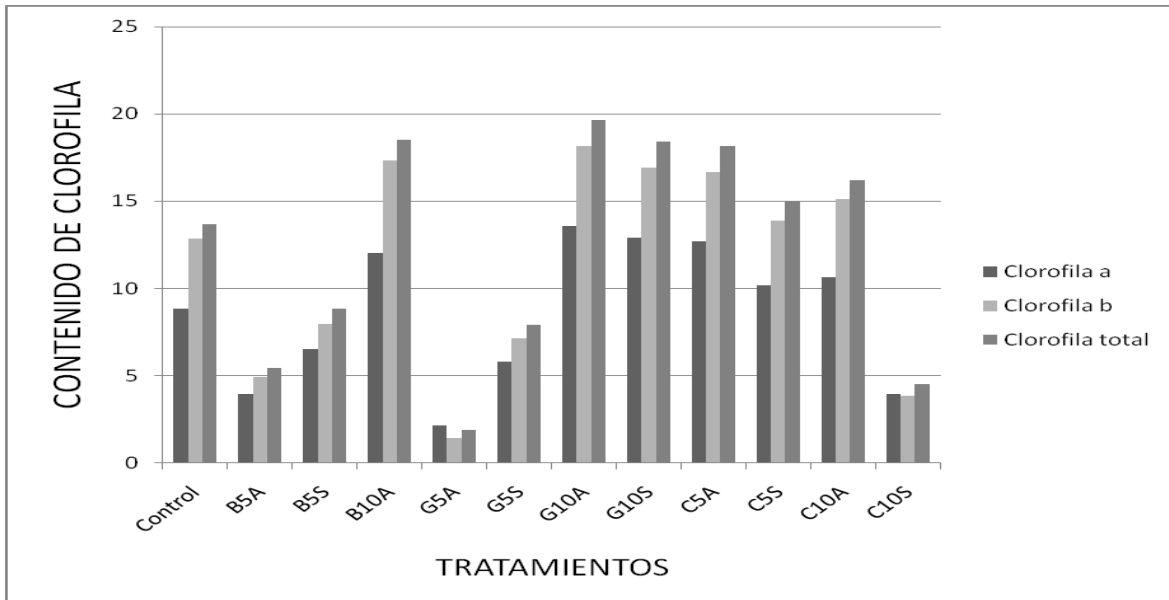
Gráfica 1. Porcentaje de germinación de semillas de chile morrón bajo diferentes tratamientos.

Lo anterior concuerda con lo presentado por Graue (1981) quien demostró que los extractos acuosos de *H. parvifolia* presentan un efecto inhibitorio en la germinación de diferentes especies. Asimismo concuerdan con lo reportado por Gámez *et al.* (2007) quienes mencionan que los extractos de *L. tridentata* y *K. humboldtiana* al 5% actúan como inhibidores de la germinación en cultivos como sandía, melón y calabaza. Gámez *et al.* (2007) también mencionan que se encontró un efecto estimulador de los extractos de coyotillo sobre la germinación de algunas especies, sin embargo, en el presente estudio dichos extractos en su concentración al 10% no afectaron significativamente el porcentaje y en concentraciones menores al 10% incluso disminuyeron el porcentaje germinativo. Esto también difiere de lo reportado por Lira-Saldivar *et al.* (2008), quienes reportan que los extractos resinosos de *L. tridentata*, tienen un efecto bioestimulante en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de frijol, maíz, lechuga y brócoli. La actividad de las sustancias alelopáticas se midió en base al crecimiento de la plántula, número de hojas y cantidad de clorofila, así como la presencia de clorosis. Durante la primera semana del experimento se presentaron síntomas de marchitamiento y muerte en algunas plántulas sometidas al tratamiento con barreta al 10% aplicado directamente al sustrato (B10S). En los tratamientos con gobernadora aplicada al sustrato, tanto en concentraciones del 5 como del 10% (G5S y G10S) se presentaron signos de clorosis en diferentes magnitudes con un 30.66%. En los tratamientos con coyotillo al 5% aplicado al sustrato (C5S) se presentó clorosis en un promedio de 17.25%. El análisis del número de hojas no encontró una diferencia significativa dentro de los tratamientos, sin embargo, se observó un mayor número de hojas en aquellos por aspersión con Gobernadora al 5 y 10% (G5A y G10A) con un promedio de 8.6 hojas por plántula (Gráfica 2). Aunque no se realizó un análisis de varianza para determinar si existía diferencia significativa entre la cantidad de clorofila encontrada en las plántulas, se observó una mayor cantidad de en los tratamientos por aspersión con barreta al 10% (B10A), por aspersión con gobernadora en concentraciones de 5 y 10%, en el tratamiento de gobernadora al 10% aplicado directamente al sustrato (G5A, G10A y G10S) y en el de coyotillo al 10% por aspersión (C10A). De igual forma, se presentó un déficit de clorofila con respecto al control en los tratamientos de barreta al 5% por aspersión y sustrato (B5A y B5S), gobernadora al 5% al sustrato (G5S) y 5% por aspersión (G5S), así como para coyotillo al 10% aplicado al sustrato (C10S) (Gráfica 3). El respectivo análisis estadístico del parámetro de longitud de las plántulas presentó diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al efecto inhibitorio y/o estimulante en el crecimiento de las plántulas. Los

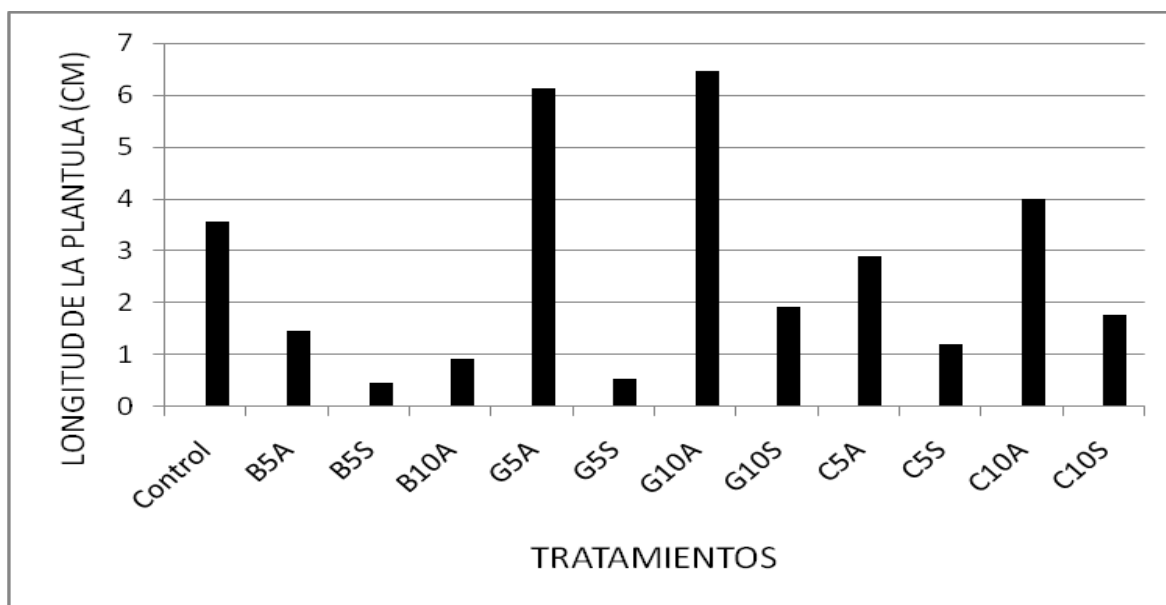
tratamientos con gobernadora al 5 y 10% aplicados por aspersión (G5A y G10A) presentaron un efecto estimulante, mientras que los de gobernadora al 5% y barreta al 5% con aplicación al sustrato (G5S y B5S) presentaron el mayor efecto inhibitor; en el tratamiento con coyotillo al 10% por aspersión (C10A) mantuvo un crecimiento similar al del control (Gráfica 4).



Gráfica 2. Hojas por plántulas de chile morrón bajo los diferentes tratamientos.



Gráfica 3. Contenido de clorofila en plántulas de chile morrón bajo los diferentes



Gráfica 4. Longitud de plántulas de chile morrón bajo los diferentes tratamientos.

CONCLUSIONES

Los extractos evaluados, excepto el de coyotillo al 10%, mostraron acción inhibitoria de la germinación de semillas de chile morrón, particularmente aquellos extraídos de gobernadora y aplicados a las semillas en sus concentraciones de 5, 3 y 1% durante 12 y 24h. Así mismo, los extractos de gobernadora y barreta (5% y 5 y 10%, respectivamente) aplicados al sustrato, presentaron un fuerte efecto inhibitor en el crecimiento de las plántulas. En menor medida, el extracto de coyotillo al 5% aplicado a sustrato también mostro un efecto inhibitor de crecimiento en plántulas. Por su acción inhibitoria estos extractos naturales no deben ser utilizados en especies de importancia económica, pero por sus características herbicidas podrían aplicarse con éxito para el control de malezas dentro de los campos de cultivo, aunque deben ser evaluadas en forma particular para cada especie.

REFERENCIAS

1. Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M. y Takeda, M. 1998. Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* 46:3468–3472.
2. Osuna G.J.A. y Wall, M.M. 1998. Prestorage moisture content affects color loss of ground paprika (*Capsicum annuum* L.) under storage. *J. Food Qual.* 21:251-259.
3. Maas, E.V. y Grieve, C.M. 1999. proa. Intl. Conference, Tando Jam, Pakistan, January. 7.
4. Lee, Y., Howard, L.R. y Villalon, B. 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *Journal of food science (USA)*. 60(3):473-476.
5. Howard, L.R., Talcott, S.T., Brenes, C.H., y Villalon B. 2000. Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum* Species) As Influenced by Maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48(5):1713–1720.
6. Graue, W.B. 1981. Estudio del potencial inhibitor y alelopático de *Helietta parvifolia* (Gray) Benth, especie del matorral submontano de Nuevo León. México. ITESM.
7. Lozano R.A. 1992. Tesis. Efectos Alelopáticos causados por extractos de *Helietta parviflora* (Gray) Benth Sobre los Componentes del Rendimiento del Frijol. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas, Monterrey N.L. México.
8. Gámez, G.H., Moreno, L.S., Ruiz G.A.E. 2007. Efecto alelopáticos de *Larrea tridentata*, *Karwinskia humboldtiana* y *Helietta parvifolia* sobre la germinación de cultivos de importancia económica y maíz. Memorias del IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V Foro de

Ciencia y Tecnología de Alimentos.

9. Lira S.R.H., Díaz C.Z., Sánchez R.Y.E., Alemán G.F.J., Molina A.G.S., Facio P.F., Vázquez B.M.E., Ruiz T.N.A. 2008. Promoción de la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de cultivos básicos y hortícolas con extractos de *Larrea tridentata*. En: Tecnología Sustentable en Semillas. Ruiz-Torres N.A. y Lira-Saldivar R.H. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Primera Edición.
10. Gámez G.H., Moreno L.S., Zavala G.F., Ríos R.A., Campos G.J., García A.A.R., Nava G.L.E. 2008. Potencial alelopático de extractos foliares de *Helietta parvifolia* L., *Karwinskia humboldtiana* L. y *Larrea tridentata* L. sobre germinación y crecimiento de tres genotipos de sorgo” Congreso Alimentos.

EFFECTO ANTAGÓNICO DE BACTERIAS Y LEVADURAS AISLADAS DE COLMENAS SOBRE PATÓGENOS DE LARVAS DE LAS ABEJAS

Marisol Sánchez Esgua, Guillermo Cruz Nicolás, Macario de Jesús Tiburcio Guzmán, Julieta Salomé Veloz Rendón y Maribel Flores González.

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, CIBA IPN. Km 1.5 Carr. Est. Santa Inés Tecuexcomac, Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, México. CP. 90700.

RESUMEN

Las abejas, como cualquier ser vivo, son susceptibles de ser atacados por diversas enfermedades, entre ellas las de origen microbiano. Colonias enfermas tienen pérdidas de producción debido a que hay baja en la población por muerte de larvas o abejas adultas, llegando a tener merma completa de la colonia en casos severos de infección y con el riesgo de contaminación al resto de colmenas en el apiario. Los métodos de control y prevención de plagas de origen microbiano incluyen la aplicación de compuestos químicos que en la mayoría de los casos dejan residualidad en la miel restándole calidad. La microbiota de la colmena es una importante fuente de microorganismos productores de compuestos biológicos que pueden utilizarse para la prevención y control de las enfermedades de las abejas. A partir de abejas y larvas se aislaron 248 cepas, se caracterizaron por morfología colonial y celular, catalasa y tinción de Gram. Pruebas de antagonismo se realizaron vertiendo medio semisólido inoculado con las cepas patógenas sobre las cepas aisladas previamente crecidas en medios sólidos, monitoreando el crecimiento cada 24 horas durante 7 días para detectar halos de inhibición. Se seleccionaron las cepas que presentaron un halo de inhibición mayor a 10 mm, 12 cepas inhibieron el crecimiento de Pl. 17 cepas inhibieron el crecimiento de Mp y 30 cepas entre levaduras y bacterias inhibieron el crecimiento de Aa in Vitro. Los resultados demuestran que es posible considerar el uso de microorganismos nativos de las colmenas para la producción de compuestos biológicos no tóxicos como una estrategia de control de enfermedades de las abejas.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales actividades agropecuarias en México es la apicultura, exportándose miles de toneladas de miel anualmente colocando a México como el séptimo productor mundial de miel¹⁰. Sin embargo, la apicultura enfrenta diversos problemas relacionados con la producción que derivan en pérdidas económicas, entre ellos se encuentran las enfermedades microbianas de las abejas, entre las que destaca la Loque Americana (LA o AFB por sus siglas en inglés), cuyo agente causal es *Paenibacillus larvae*, una bacteria que afecta a las larvas de las abejas melíferas, y una enfermedad de difícil erradicación, controlada principalmente mediante la destrucción de la colonia⁷. Loque Europea, causada por *Melissococcus pluton*, también es considerada como una enfermedad severa de las larvas de abeja⁶, puede causar baja densidad poblacional y baja acumulación de miel. Por último se encuentra la Ascosferosis, una micosis invasiva causada por *Ascospaera apis* que afecta únicamente a las larvas. Generalmente, el tratamiento y prevención de estas enfermedades es la aplicación constante y excesiva de antibióticos y químicos que afectan la calidad de la miel al presentar residuos de antibióticos, además, de crear resistencia en las cepas causales de las infecciones.

Por otro lado, se sabe que las colmenas de *Apis mellifera*, presentan una microbiota asociada propia, con un comportamiento microbiológico característico. Sistemas antimicrobianos ocurren naturalmente y abundan en las abejas y en su alimento y tienen un papel importante en el mantenimiento de un ambiente libre de microbios. En estudios realizados por diversos autores, han encontrado gran diversidad de microorganismos, bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y Gram-variables, aeróbicas como anaeróbicas, e incluso bajo algunas condiciones de humedad se encuentran levaduras. Son microorganismos que no tienen acción negativa sobre la miel y no son peligrosos para la salud humana⁸. Por lo que el uso de microorganismos nativos de las colmenas puede constituir una importante fuente de compuestos biológicos no tóxicos como alternativa para el tratamiento de las enfermedades microbianas.

PARTE EXPERIMENTAL

El aislamiento de microorganismos se llevó a cabo macerando las muestras de larvas y abejas e inoculando en los medios de cultivo MPL10, MPL40, PDA y Agar Nutritivo. Las placas se incubaron a 30°C durante 72 horas. Se seleccionaron y purificaron las colonias morfológicamente diferentes crecidas en cada medio, se realizó frotis para observar detalladamente la morfología macro y microscópica. A las colonias bacterianas se les realizó además tinción de Gram y prueba de catalasa. Para las pruebas de antagonismo, las cepas aisladas se sembraron en los medios de cultivo MPL10, MPL40, PDA y Agar Nutritivo, por duplicado y por cada caja se sembraron 3 cepas. Se incubaron a 30°C durante 3 días.

Pasadas las 72 horas de incubación, se preparó medio ICC semisólido (1% de agar) se esterilizó y se dejó enfriar hasta aproximadamente 40°C para inocularlo con 500 µl/L del stock de la cepa PI, para la cepa Mp preparó medio ATCC 1430 semisólido y se realizó el mismo procedimiento. Los medios de cultivo se homogenizaron y se vertió sobre las cepas de tres días de crecimiento de tal manera que cubriera las colonias. Se dejó gelificar y se incubaron a 37°C durante 5 días, monitoreando cada 24 horas para detectar halos de inhibición. Una vez detectados se midían los halos con un vernier. Se seleccionaron las cepas que presentaron un halo de inhibición mayor a 7 mm.

RESULTADOS

Se aislaron un total de 152 microorganismos, se caracterizaron por morfología colonial y celular, tinción Gram y catalasa. Se conservaron en glicerol al 30% a -70°C. Se presentaron formas bacilares y cocos, siendo las formas bacilares las de predominio, resultados que son consistentes con datos reportados por Guillian (1997). Las pruebas de catalasa realizadas a las bacterias indican un alto número de cepas catalasa positiva sobre las cepas catalasa negativa (figura 1). Mientras que, los resultados de las tinciones Gram mostraron un mayor número de bacterias Gram variable (figura 2), resultados que concuerdan con las investigaciones realizadas por Guillian en donde indica que las bacterias Gram-variable son los microorganismos intestinales más comunes en la abejas melíferas así como en el polen floral y en algunas muestras de miel e incluso en las larvas. Concluye Guillian (1997) que al parecer estos microorganismos contribuyen con algunos metabolitos como enzimas intestinales útiles para las abejas. En nuestro trabajo, encontramos que también las bacterias Gram positivas son predominantes. En la tabla 1 se presentan las formas celulares encontradas entre los aislamientos bacterianos y su relación con las pruebas de tinción Gram y catalasa. En cuanto a las levaduras, la mayoría de las cepas aisladas presentaron borde entero, de color crema o rosa, mate y superficie lisa. Se encontraron en menor número en comparación con las bacterias, que con base a resultados publicados por Guillian, la aparición de levaduras puede indicar condiciones de estrés en las abejas y ser más abundantes en primavera.

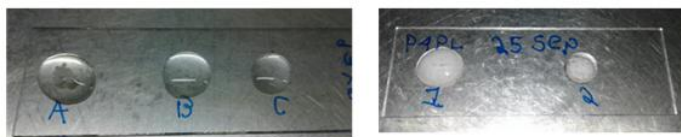


Figura 1. Prueba de catalasa. Las cepas A, 1 y 2 presentan catalasa positiva. Las cepas B y C, presentan catalasa negativa

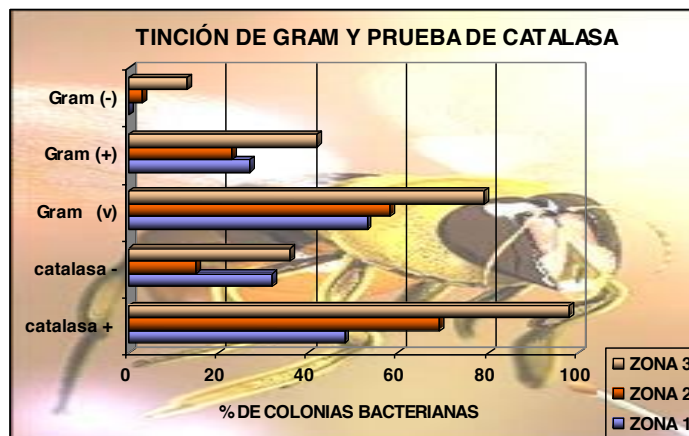


Figura 2. Tinción de Gram y prueba de catalasa de cepas bacterianas obtenidas de las zonas de estudio.

Tabla 1. Variación morfológica, tinción de Gram y catalasa encontradas en las bacterias aisladas

FORMAS CELULARES AISLADAS	TINCION GRAM	CATALASA
Cocos	+	+
Bacilo	+	+
Bacilo	+	-
Bacilo	Variable	+
Bacilo	-	-
Bacilo	Variable	-
Bacilo	-	+

Respecto a las pruebas de antagonismo, para *P. larvae* 9 levaduras y 3 bacterias presentaron una alta actividad inhibiendo su crecimiento presentando halos de inhibición entre 13 y 28 mm y 10 y 13 mm, respectivamente (tabla 2 y figura 3). Para la cepa Mp se seleccionaron 17 cepas, entre levaduras y bacterias (tabla 3), aunque hubo mayor número de cepas que presentaron actividad antagónica, aquellas catalogadas con inhibición muy buena, alcanzaron hasta 20 mm de halo de inhibición, siendo más bajo que en el caso de los datos presentados para PI, en el que se alcanzaron hasta 28mm.

Tabla 2. Cepas de levadura que presentaron actividad contra la cepa patógena *P. larvae*.

No. cepa	Clave Cepa	Inhibición (mm)
1	YMXPC11	20
2	YM VA AV1	26
3	YM VA MC 43	21
4	YM X NINFA 11	28
5	NC3 YM	12
6	LC1	13
7	N 132	15
8	M 41	18
9	CS PA PH 10-3	16

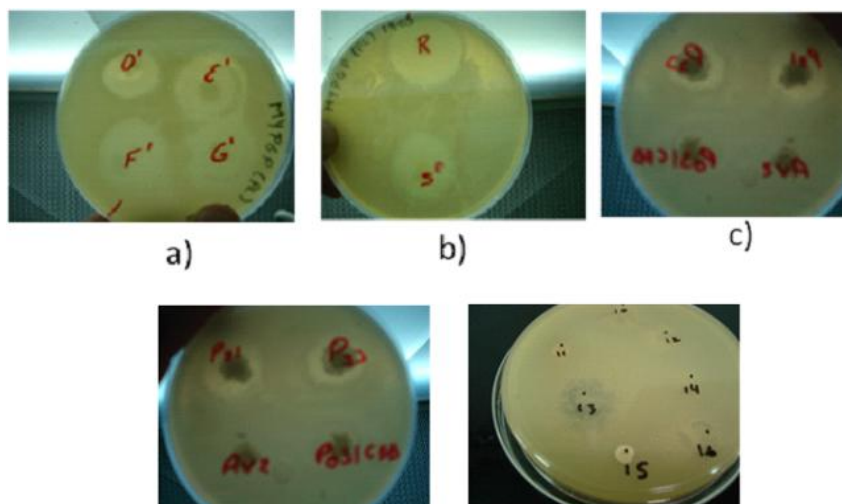


Figura 3. Pruebas de antagonismo. a) y b) cepas con alta actividad inhibitoria, c) cepas con baja y nula actividad inhibitoria contra la cepa PI.

Tabla 3. Cepas que inhibieron el crecimiento de la cepa Mp.

No. Cepa	Clave	Inhibición
19	YM VA LC13	Regular
11	M 11	Regular
103	YM PAH LC2 10-1	Regular
70	LV2	Bueno
56	AVL	Bueno
25	miel 1 10-1 sl	Regular
150	40% X PC 33	Regular
41	P31	Bueno
41	26	Regular
30	15	Bueno
33	C.6.1 PAH	Regular
15	ABV 3 SNF	Regular
53	PM 13	Bueno
33	A 33	Bueno
2	A9	muy bueno
4	A2	muy bueno
26	A26	Bueno

Referente a los microorganismos evaluados contra la cepa patógena *A. apis*, 25 cepas entre bacterias y levaduras presentaron actividad inhibitoria in Vitro. En la tabla 4 se presentan los resultados de las cepas que inhibieron al hongo *Ascosphera apis*.

Tabla 4. Cepas capaces de inhibir el crecimiento in Vitro de la cepa Aa.

CEPA	INHIBICIÓN (MM)	CEPA	INHIBICIÓN (MM)
LC20	11	AV 2	11
A 26 ⁸	18	YM PAH LC4 10 ¹	18
A39 ⁹	16	C2 ZACO AV	10
A2 ¹⁰	19	YM VA MC 41	15
P RESIST 10-2	15	L2 B ²	20
L XAL 10-2 L ⁶	20	POLEN10-2 V.A	13
B.V.A ⁷	19	32 ³	21
LC23 SAN	11	11	13
PC13	11	34	15
10-2 vpa	11	45 ⁴	19
ABV G b	11	54 ⁵	17
10 M-4 V.A	12	LC43	10
		LC31	11

En la figura 7 se presentan algunas de las placas que muestran la actividad antagónica de cepas aisladas contra el hongo *A. apis*.

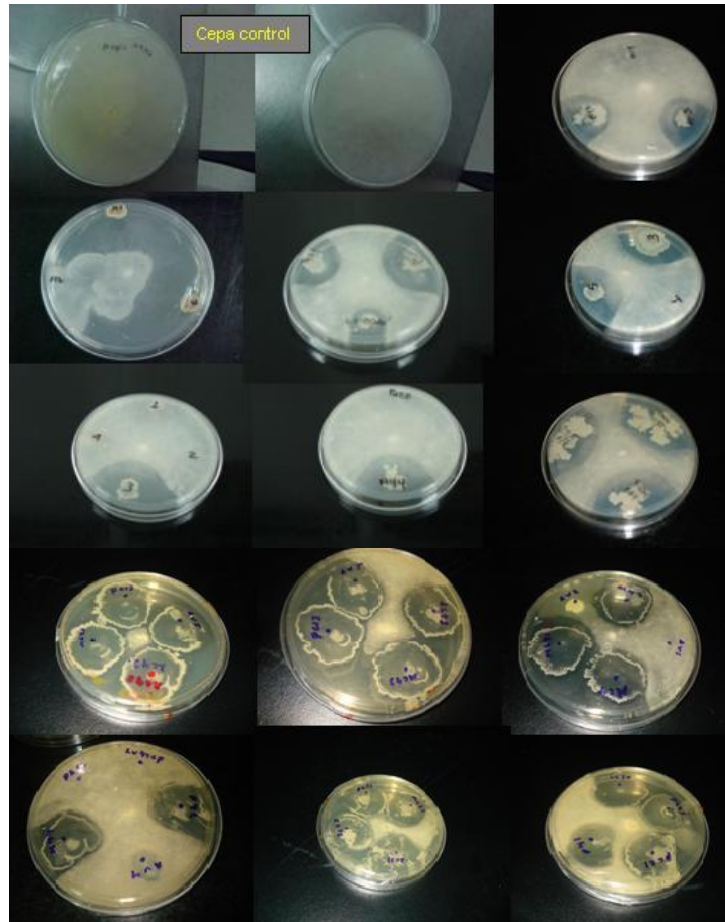


Figura 7. Cepas que inhibieron el crecimiento in Vitro del hongo *A. apis*.

Bacterias del genero *Bacillus* han sido reportadas mayoritariamente como cepas con actividad antagónica contra *P. larvae*, y con mayor actividad inhibitoria contra hongos y bacterias, además de ser un grupo asociado a las abejas como microflora normal. Factor que se atribuye a la capacidad de estas cepas para secretar antibióticos o compuestos similares, bacteriocinas o antifungales (Guilliam, 1997 y Alippi, 1996). Se tienen pocos reportes de trabajos de actividad antagónica contra *M. pluton*, la mayoría de estudios con este patógeno reportan actividad antagónica de bacterias del genero *Bacillus*, otros trabajos refieren pruebas con otros antibióticos o aceites esenciales, ninguno hasta el momento ha reportado estudios con levaduras.

En nuestro trabajo, además de encontrar cepas bacterianas con actividad, también se tienen datos con levaduras, tanto para inhibición del crecimiento de PI como de Mp, mostrando en algunas mediciones mayor actividad que las bacterias. Estos son datos relevantes puesto que hasta el momento no se han encontrado registros de trabajos que reporten actividad por levaduras contra *M. pluton* o *P. larvae*.

CONCLUSIONES

Un punto relevante de este trabajo fue encontrar que las levaduras presentaron mayor actividad inhibitoria contra las cepas patógenas *P. larvae* y *M. pluton*, en comparación con las bacterias, de las que se ha reportado al género *Bacillus* como los principales antagonistas y no se han encontrado estudios reportados con levaduras para el control de las Loques. Además, para *M. pluton* se tienen muy poco trabajos relacionados con la actividad antagónica, y se menciona igualmente a bacterias del genero *Bacillus* como cepas con actividad inhibitoria.

El uso de microorganismos nativos de las colmenas para el control de enfermedades de larvas y abejas, permitirá la producción de miel de mayor calidad al aplicarse compuestos biológicos con nula residualidad. Además de incrementar la vida media de las colmenas y el incremento de la población. Los resultados demuestran que es posible considerar el uso de microorganismos nativos de las colmenas como una estrategia de control de enfermedades de las abejas para evitar el uso excesivo de antibióticos.

BIBLIOGRAFIA

1. Alippi, A. M. 1996. Caracterización de aislamientos de *Paenibacillus larvae* mediante tipo bioquímico y resistencia a oxitetraciclina. Rev. Arg. Microbiol. 28, 197 – 203
2. Barry A.L. (1986). Procedures for testing antimicrobial agent in agar media: Theoretical consideration. Pág. 1
3. Brodsgaard J. C. & H. Hansen. 2003. Tolerance mechanisms against American Foulbrood in honey bee larvae and colonies, APIACTA 38,114 – 124.
4. Brodsgaard J. C., Hansen H. 1999. Decontamination of beehives containing spores of the Foulbrood bacterium *Paenibacillus larvae larvae*. APIACTA XXXIV, 26 – 32 (1999).
5. Forsgren, E. 2010. European foulbrood in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology 103:S5–S9
6. Hansen H., Brodsgaard C. (1999). “American Foulbrood: a review of its biology, diagnosis and bee control”. Bee World, 80:11, 5 – 23
7. Jelinski, M. (1985). “Some biochemical properties of *Bacillus larvae* White”. Apidologie,16, 69 – 76.
8. Kilwinski J., Peters Martin, Ashiralieva Ainura, Genersch Elke. 2004. Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM3615 (ATCC49843) as *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. Veterinary Microbiology 104, 31 -42.
9. Gilliam M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiology Letters 155:1-10
10. Okayama A., Sakogawa T., Nakajima C., and Hayama T., (1994) Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American foulbrood on honeybee in Japan. Journal Vet. Med. Sci. 58, 439-441
11. SAGARPA: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/la-miel-en-mexico-y-el-mundo?idiom=es>

DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE COSECHA EN EJOTE MORADO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

Alma Karina Garzón-García¹, Mayra Acosta-García², Dionicio Ruíz-Landa³, José Cruz Carrillo-Rodríguez⁴, Araceli M. Vera-Guzmán⁵, Elia Nora Aquino Bolaños¹ y José Luis Chávez-Servia⁵

¹ Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas, Maestría en Ciencias Alimentarias;

² Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas; ³ Unidad de Capacitación para el Desarrollo Rural No. 2; ⁴ Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca; ⁵ Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Oaxaca. noraquinouv@gmail.com

RESUMEN

El ejote de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un fruto importante en la dieta diaria de los mexicanos que se consume en diferentes estados de desarrollo (ED), dependiendo de la zona y la forma de consumo. El objetivo de este estudio fue determinar los índices de cosecha de ejote morado con base en sus características físicas (largo, ancho, grosor y parámetros de color), fisicoquímicas (acidez titulable, pH, sólidos solubles y azúcares totales) y el contenido de compuestos con actividad antioxidante. Se evaluaron cuatro estados de desarrollo y se observó que las dimensiones fueron mayores en ED4, mientras que la acidez titulable fue menor, característica deseable para su consumo. El color morado del ED4 se relacionó con la presencia de antocianinas (2.5 mg Cianidina-3-Glu * g⁻¹). El contenido de polifenoles se encontró en el intervalo de 6.8-9.95 mg EAG* g⁻¹, mientras que la actividad antioxidante fue mayor en ED1 y ED4 (35.71 y 33.40 μmol ETrolox * g⁻¹, respectivamente). El color (h°), humedad y azúcares totales pueden ser utilizados como índices de cosecha para diferenciar tres estados de desarrollo de ejote de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Los resultados de polifenoles y actividad antioxidante indican la conveniencia de promover el consumo de ejote morado en los estados de desarrollo uno y cuatro.

INTRODUCCIÓN

El ejote de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un fruto consumido alrededor de todo el mundo, con un alto valor nutrimental, económico y social. En países en desarrollo, el ejote forma parte hasta el 40% de la ingesta diaria de proteínas totales debido al acceso limitado de proteína animal. También es rico en nutrientes como carbohidratos, vitaminas (E y C), fibra dietaria y minerales como Fe, Mg, Ca, P, K, Cu y Zn. Además del contenido nutrimental, el ejote contiene fitoquímicos como polifenoles, los cuales han demostrado que aportan benéficos a la salud del consumidor (Wettasinghe *et al.*, 2002, Jiratanan *et al.*, 2004; Ige, 2012; Pretti *et al.*, 2017). En cuanto a producción, México ocupa 12° lugar mundial. El estado de Morelos es el principal productor, mientras que Veracruz y Oaxaca ocupan 6° y 11° lugar, respectivamente. Por su parte en Oaxaca, el ejote se cosecha y se consume en un estado de desarrollo (ED) más avanzado al que comúnmente se consume en el resto del país (SIAP, 2017).

En general los índices de cosecha se basan en una serie de escalas morfológicas, físicas o químicas establecidas, como son el número de días después de la floración, color, forma del fruto, tamaño y de manera especial el diámetro alcanzado de la vaina; sin embargo, este último presenta la desventaja que no todos los frutos tienen las dimensiones esperadas a pesar de estar en su madurez hortícola (Neuvel, 1988; Hay, 1995). Por lo que es necesario establecer los índices de cosecha en ejote morado, con base en sus características fisicoquímicas, así como en el contenido de compuestos con actividad antioxidante.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Se emplearon muestras de ejote (*Phaseolus vulgaris* L.) en cuatro estados de desarrollo seleccionados de acuerdo al tamaño y color visual. Los ejotes fueron cosechados en la Unidad de Capacitación para el Desarrollo Rural (UNCADER), ubicado en el municipio de Coatepec, Ver. La población nativa cultivada fue la etiquetada como 38 y fue proporcionada por el Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Oaxaca. Para realizar los análisis, se utilizaron 20 frutos de cada estado de desarrollo.

Preparación de extractos

Extracto acuoso

Se pesó 1 g de vaina de ejote en los diferentes ED, se homogenizó (Nutribullet, NBR-12XX, LA, E.U.A.) con 45 ml de agua destilada durante 30 s a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró y centrifugó a 4000 rpm a 10 °C durante 20 min (Hettich Zentrifuge Universal 32R Tuttlingen, Alemania). El sobrenadante fue utilizado para el análisis.

Extractos etanólicos

Para la determinación de azúcares totales se preparó un extracto siguiendo el método descrito por Dubois *et al.* (1956). Se pesó 1 g de tejido en cada uno de los ED el cual fue homogenizado (WiseTis-Homogenizer, Wisd Laboratory instruments, Germany) con 30 ml de etanol al 80% (v/v). El homogenizado se incubó a -20 °C durante 24 h.

Para la determinación de antocianinas monoméricas, polifenoles y actividad antioxidante, el extracto fue preparado con 5 g de ejote sin semillas cortado en trozos, los cuales fueron homogeneizados (DAIHA-Brand HG-IS-A, Gangwan, Korean.) a 50 rpm durante 30 s con 25 ml de etanol al 80% (v/v), posteriormente, se filtró y centrifugó a 4000 rpm durante 20 min a 10 °C (Hettich Zentrifuge Universal 32R Tuttlingen, Alemania). El sobrenadante fue utilizado para realizar el análisis.

MÉTODOS

Dimensiones

Se seleccionaron 20 frutos de cada ED y se tomaron medidas con un vernier digital las dimensiones de largo (cm), ancho (cm) y grosor (cm).

Color

Se determinó mediante un espectrofotómetro para sólidos (Konica Minolta CM-2600d, Osaka, Japón). Los parámetros evaluados fueron L^* , a^* , b^* , C^* y h° , Donde L^* corresponde al valor de luminosidad en una escala del 0 al 100 que corresponde a negro y blanco, respectivamente. A su vez, a^* y b^* son coordenadas cromáticas, valores de a^* negativo a positivo indica verde a rojo; b^* negativo a positivo indica azul al amarillo. Mientras que C^* indica la cromaticidad, es decir, la pureza del color y h° o ángulo de matiz se refiere al tono.

Humedad

El contenido de humedad se determinó mediante el uso de una termobalanza (VELAB VE-50-5 Illinois, USA) tomando 2 g de tejido para los diferentes ED a una temperatura constante de 135 °C.

Sólidos solubles totales

Se determinaron los sólidos solubles por medio de un refractómetro digital (ATAGO Palette digital refractometer, USA) y se reportó como °Brix. Las lecturas se realizaron por cuadruplicado para cada extracto de los diferentes estados de desarrollo.

Acidez titulable y pH

Se determinó la acidez titulable y pH del ejote de frijol común en cuatro estados de desarrollo por el método basado en las normas mexicanas NMX-FF-011-1982 y NMX-FF-010-1982. Se tituló una alícuota de 10 ml de cada extracto con NaOH 0.1 N usando como indicador fenolftaleína y hasta registrar un valor de pH de 8.2. El resultado fue expresado en g de ácido cítrico 100 g⁻¹ BS. El pH inicial de los extractos de las muestras de ejote mediante fueron medidos con un potenciómetro previamente calibrado (OAKTON, 510, Vernon Hills, USA).

Azúcares totales

Se determinó el contenido de azúcares totales por el método Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) tomando 100 µL de sobrenadante del extracto etanólico de cada ED con 900 µL de fenol al 80% (v/v) y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se incubó a 30 °C durante 20 min y se midió la absorbancia a 490 nm. La cuantificación de azúcares totales se realizó a través de una curva estándar de glucosa en un intervalo de concentración de 0.006 a 0.12 mg mL⁻¹.

Polifenoles

La determinación de fenoles totales se realizó siguiendo la metodología descrita por Singleton y Rossi (1965). A 400 µl del extracto se adicionaron 1 ml de agua destilada y 200 µL del reactivo Follin-Ciocalteu. Posteriormente se agregaron 2 ml de Na₂CO₃ al 7% (p/v) y se aforó a un volumen total de 5 ml con agua destilada, incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación se leyó en un espectrofotómetro (JENWAY 6305, Sttafordshire, United

Kingdom) a 750 nm. La cuantificación se realizó a través de una curva estándar de ácido gálico (0.021 a 0.165 mg EAG ml⁻¹).

Antocianinas monoméricas

La determinación de contenido de antocianinas monoméricas en las muestras de ejote se realizó por el método de pH diferencial de acuerdo con lo descrito por Giusti y Wrolstad (2001) Se utilizó soluciones amortiguador de cloruro de potasio ajustado a pH 1 y acetato de sodio a pH 4.5, los cuales fueron adicionados a 600 µl de la muestra, llevándolos a un volumen final de 3 ml. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 510 nm como absorbancia máxima en el intervalo visible de 420-700 nm con un blanco de metanol al 80%. El contenido de antocianinas monoméricas se reportó como mg de Cianidina-3-O-glucósido g⁻¹ BS.

Actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante, en los cuatro estados de desarrollo, se realizó por el método 2,2-difenil-1-picrilhidracil o DPPH descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). A 100 µL de cada extracto se adicionaron 2.9 mL del reactivo de DPPH, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Para la cuantificación se realizó una curva estándar de Trolox (0.13 a 0.79 µmol ETrolox/ mL⁻¹)

RESULTADOS

Dimensiones

El ED1 fue diferente a los restantes respecto a las características de largo, ancho y grosor (Cuadro 1). Fernández *et al.* (1986) reportaron que durante las dos últimas etapas de desarrollo del cultivo de la planta de frijol se lleva a cabo el llenado de semillas de la vaina (etapa R8) y obtención del grano (etapa R9), con base a este autor el ED1 de este estudio se puede ubicar en la etapa R8 mientras que ED2, ED3 y ED4 se encuentran en el cambio de R8 a R9.

Color

Los parámetros de color fueron similares para ED1 y ED2. Por el contrario, el valor de L* fue menor en ED3 y ED4 con diferencia entre ellos y respecto a ED1 y ED2, lo que indica el oscurecimiento de la vaina. La misma tendencia se observó en los parámetros b*, C* y h°. El cambio en el índice de matiz h° significó el cambio de color de los tonos amarillos hacia el tono rojo-morado. Kasim y Kasim (2015) evaluaron el color en ejote durante el almacenamiento y reportaron valores de L*=65.93, a*=-14, h°=115.7, el valor de h° es similar al observado en ED1 de este estudio.

Cuadro 1. Dimensiones de los frutos en los diferentes estados de desarrollo del ejote *Phaseolus vulgaris* L.

Estado de Desarrollo	Dimensiones			
	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)	Largo/ancho
ED1	11.87 ± 1.63 ^c	0.84 ± 0.12 ^c	0.68 ± 0.11 ^b	14.2 ^a
ED2	13.59 ± 1.36 ^b	1.07 ± 0.07 ^{ab}	1.00 ± 0.07 ^a	12.7 ^b
ED3	14.04 ± 1.25 ^{ab}	1.04 ± 0.07 ^b	0.96 ± 0.09 ^a	13.5 ^{ab}
ED4	14.87 ± 0.99 ^a	1.13 ± 0.05 ^a	1.02 ± 0.20 ^a	13.1 ^b

Valores promedio ± SD (n = 20). Valores promedio de cada parámetro con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey p≤0.05).

Cuadro 2. Parámetros de color en los diferentes ED de ejote *Phaseolus vulgaris* L.

Estado de Desarrollo	Parámetros de color ¹				
	L*	a*	b*	Color C*	Color h°
ED1	53.44 ± 1.27 ^a	-6.87 ± 0.29 ^b	17.40 ± 0.84 ^a	18.71 ± 0.85 ^a	111.54 ± 0.83 ^a
ED2	54.69 ± 1.40 ^a	-6.36 ± 0.46 ^b	17.70 ± 0.31 ^a	18.81 ± 0.31 ^a	109.75 ± 1.40 ^a
ED3	42.15 ± 1.33 ^b	1.56 ± 0.69 ^a	5.14 ± 1.91 ^b	5.46 ± 1.68 ^b	70.50 ± 12.46 ^b
ED4	37.40 ± 0.32 ^c	2.03 ± 0.15 ^a	0.85 ± 0.14 ^c	2.21 ± 0.16 ^c	22.78 ± 3.33 ^c

¹ Se reporta la media ± SD (n = 4). Las medias que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes, Tukey (P<0.05).

Humedad y sólidos solubles

El porcentaje de humedad fue similar entre ED1 y ED2 (≈ 90%) y disminuyó en los estados ED3 y ED4 a 88.17 y 85.50 %, respectivamente. (Cuadro 3). Los frutos como el ejote, durante su desarrollo pierden crujencia debido al decremento del contenido de humedad. Martínez *et al.* (1995) evaluaron el contenido de humedad en dos tamaños diferentes de vainas de ejote (*Phaseolus vulgaris* L.) de las variedades Strike y Bina y reportando valores de 89.2 - 75.6 % y 82.1 - 74.0 %, respectivamente. El contenido de sólidos solubles tuvo un valor de 5 °B sin diferencia entre los estados de desarrollo.

Cuadro 3. Contenido de Humedad ejote (*Phaseolus vulgaris* L.) en diferentes estados de desarrollo.

Estado de Desarrollo	Humedad (%)
1	90.17 ± 0.29 ^a
2	89.67 ± 0.58 ^a
3	88.17 ± 0.29 ^b
4	85.50 ± 1.32 ^c

Acidez titulable

La acidez titulable fue mayor en el ED1 (2.8 ± 0.16 g ácido cítrico 100 g⁻¹ BS), seguida de ED3. En los estados ED2 y ED4, no mostraron diferencia (Figura 1A). La disminución en la acidez generalmente se ha relacionado con consumo de ácidos orgánicos presentes en el fruto, como sustratos propios de la respiración en la síntesis de otros componentes (Kader, 1992).

pH

El pH se reportó en un intervalo de 6.36-6.82 en los diferentes ED. Se encontraron diferencias únicamente entre los valores promedio de ED1 y ED4 (Figura 1B). Martínez *et al.* (1995), reportaron valores de pH de 6.2 y 6.4 en las variedades Strike y Bina, respectivamente, estos datos son similares a los observados en *Phaseolus vulgaris* L.

Azúcares totales

El contenido de azúcares totales en los cuatro ED se registró en un amplio intervalo de 203.70 a 32.74 mg Glucosa g⁻¹ BS. ED1 y ED2 no mostraron diferencia; por el contrario, ED3 y ED4 fueron menores (Figura 1C). En general, las hortalizas contienen una gran cantidad de azúcares solubles, responsables de las características sensoriales y valor nutrimental, en ejote esta fracción de azúcares está constituida principalmente por glucosa, fructosa y sucrosa. Sin embargo, durante el desarrollo de la planta de frijol implica una serie coordinada de procesos bioquímicos que, entre otras cosas, dan como resultado la biosíntesis y la degradación de componentes del fruto, como son los carbohidratos (Stolle-Smits *et al.*, 1999; de Cortes Sánchez-Mata *et al.*, 2002)

Fenoles totales y antocianinas

El mayor contenido de polifenoles se observó en ED1 con un valor promedio de 9.96 mg EAG g⁻¹ BS. ED2 y ED3 registraron decremento, pero hubo un incremento en el último ED (9.10 mg EAG g⁻¹ BS; Figura 1D). El alto contenido de polifenoles en el ED1 puede ser atribuido a la presencia de polifenoles como Kaemferol, catequina, epicatequina y flavan-3-oles reportados en ejote (Price *et al.*,

1998; Escarpa y Gonzales 2000) que se caracterizan principalmente por atribuir astringencia a los frutos, durante el transcurso de la madurez estos compuestos son degradados por enzimas. Con la madurez también se sintetizan pigmentos responsables de la coloración morada del ejote, como las antocianinas (Pretti *et al.*, 2017). Las antocianinas monoméricas se detectaron únicamente en ED4 con un valor promedio de 2.54 mg Cianidina-3-glucósido g⁻¹ BS. Las antocianinas, pertenecen al grupo de los polifenoles y son caracterizadas por atribuir tonalidades rojo-morado a las diferentes partes de una planta (Fernández *et al.*, 1986), por lo que era de esperarse su presencia en el ED4.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante presentó tendencia similar al contenido de fenoles totales y se observó un decremento en los ED2 y ED3 con respecto ED1 y ED4 (Figura 1E). Por lo que se esperaría mayores beneficios potenciales al consumir el ejote en los estados de madurez uno y cuatro.

CONCLUSIÓN

Los parámetros fisicoquímicos de color, a través del ángulo de matiz (h°), azúcares totales y humedad pueden ser utilizados como índices de cosecha ya que permiten diferenciar de manera objetiva tres distintos estados de desarrollo de ejote morado. Debido al mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante en los estados de madurez uno y cuatro, se puede recomendar el consumo de ejote modado en estos estados de madurez.

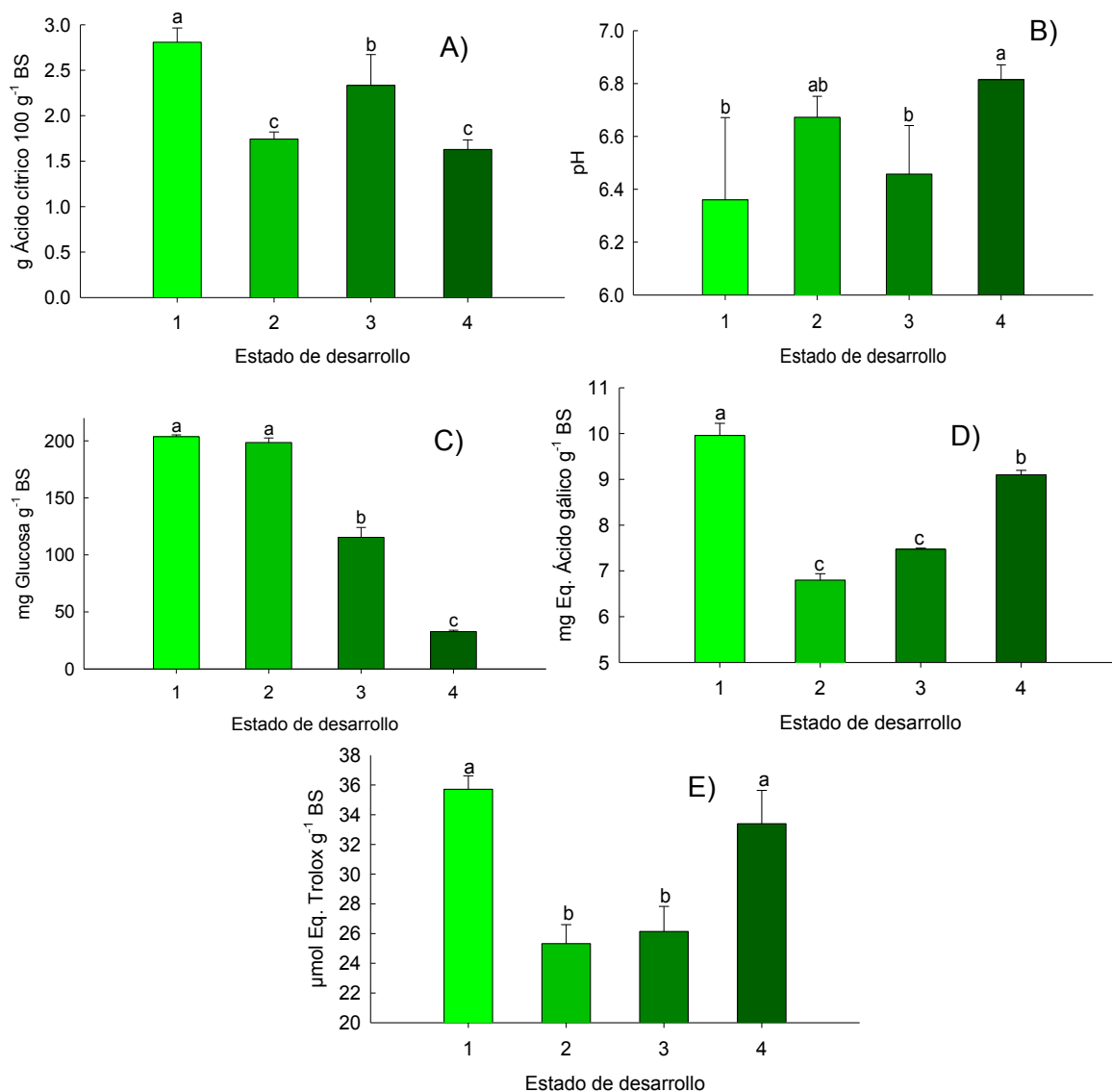


Figura 1. Cambios en la acidez titulable (A), pH (B), azúcares totales (C) fenoles totales (D) y actividad antioxidante (E) en los diferentes ED del ejote *Phaseolus vulgaris* L. Letras distintas indican diferencia significativa, Tukey ($P < 0.05$).

BIBLIOGRAFÍA

1. Brand-Williams W., Cuvelier M., y Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28:25-30.
2. de Cortes Sánchez-Mata, M., Cámara-Hurtado, M., y Díez-Marqués, C. (2002). Identification and quantification of soluble sugars in green beans by HPLC. *European Food Research and Technology*, 214(3), 254-258.
3. Dubois M., Guilles K., Hamilton J., Rebers P., y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356.
4. Escarpa, A., y González, M. C. (2000). Identification and quantitation of phenolics from green beans by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 52(1-2), 33-38.

5. Fernández, F., Gepts, P., López, M. 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. 34 p
6. Hay, R. K. M. (1995). Harvest index: a review of its use in plant breeding and crop physiology. *Annals of applied biology*, 126(1), 197-216
7. Ige, O. D. (2012). Comparison of the Quality aspects of Organic and Conventional Green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) (Doctoral dissertation)
8. Jiratanan, T., Liu, R. H. 2004. Antioxidant activity of processed table beets (*Beta vulgaris* var, *conditiva*) and green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(9): 2659-2670}
9. Kader, A. 1992. Biología y tecnología poscosecha: Una revisión general. In: Kader, A. A. (ed). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Universidad de California, publicación, 3311: 311-325.
10. Kasim, R., y Kasim, M. U. (2015). Biochemical changes and color properties of fresh-cut green bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. *gina*) treated with calcium chloride during storage. *Food Science and Technology*, 35(2), 266-272.
11. Martínez, C., Ros, G., Periago, M. J., Lopez, G., Ortuno, J., Rincón, F. 1995. Physico-chemical and sensory quality criteria of green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *LWT - Food Science and Technology*. 28(5):515-520.
12. Neuvel, J. J., y Dekker, P. H. M. (1988). Seed development as a parameter for maturity, quality, and relative yield of French beans (*Phaseolus vulgaris*). In *IV International Symposium on Quality of Vegetables* 244 (pp. 65-72).
13. Preti, R., Rapa, M., y Vinci, G. 2017. Effect of steaming and boiling on the antioxidant properties and biogenic amines content in Green Beans (*Phaseolus vulgaris*) varieties of different colours. *Journal of Food Quality*, 1-8
14. Price, K. R., Colquhoun, I. J., Barnes, K. A., Rhodes, M. J. C. 1998. Composition and content of flavonol glycosides in green beans and their fate during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12):4898-4903.
15. SIAP, 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance de Siembras y Cosechas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca (SAGARPA). México.
16. Singleton V., y Rossi J. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdephosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-56.
17. Stolle-Smits, T., Beekhuizen, J. G., Kok, M. T., Pijnenburg, M., Recourt, K., Derksen, J., y Voragen, A. G. (1999). Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. *Plant Physiology*, 121(2), 363-372.
18. Virgilio, M. 2003. Guía Técnica: Cultivo del Ejote. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, 18:8-9.
19. Wettasinghe, M., Bolling, B., Plhak, L., Parkin, K. 2002. Screening for phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of common vegetables. *Journal of food science*, 67(7): 2583-2588.

USO DE *NELUMBO NUCIFERA* (FLOR DE LOTO) COMO ORGANISMO CON POTENCIAL FITORREMIADOR.

Erick Rodolfo López Almanza, Mariela Rodríguez Vargas

Instituto Tecnológico Superior de Abasolo. erick.almanza@tecabasolo.edu.mx

RESUMEN

En la mayoría de las comunidades de Guanajuato no hay plantas para el saneamiento de sus aguas negras debido a los altos costos de operación; siendo contenidas en fosas sépticas. En la comunidad Ordeña de Barajas, del municipio de Pénjamo, Gto., no cuentan con una fosa séptica, por lo que estas aguas son vertidas en un canal situado al lado de la vía de acceso principal. Las aguas negras se componen principalmente de materia orgánica, coliformes y sólidos suspendidos. *Nelumbo nucifera* puede utilizar grandes cantidades de materia orgánica como abono, por tal motivo el objetivo de este trabajo fue reducir la concentración de los contaminantes orgánicos presentes en las aguas negras mediante *N. nucifera* y determinar si puede utilizarse como organismo fitorremediador. El tratamiento se realizó en tinas con capacidades de 210 litros, se usaron 9 semillas de la planta y 180 litros de aguas negras por tratamiento. Los parámetros analizados y sus concentraciones iniciales fueron: 276.93 mg/L de DBO₅; <0.20 mg/L del cloro total; 7.60 U de pH; 43,000,000 NMP/100 mg de coliformes fecales; 43,000,000 NMP/100 mg de coliformes totales y 43,000,000 NMP/100 ml de *E. coli*, el proceso se mantuvo con monitoreo semanal durante un mes, tras lo cual las plantas decayeron. Las concentraciones finales fueron: 15.16 mg/L de DBO₅, 0.05 mg/L del cloro total, 8.17 U de pH, 39 NMP/100 mg de coliformes fecales, 460 NMP/100 mg de coliformes totales y 11 NMP/100 ml de *E. coli*. Los resultados muestran una reducción significativa de los parámetros analizados, esto muestra que *N. nucifera* puede utilizarse para la reducción de contaminantes orgánicos, aunque estos no se eliminaron, quedaron por debajo o en el límite de los LMP de las normas correspondientes.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua, tanto superficial como subterránea puede generar problemas de salud a la población que hace uso de ella. El crecimiento urbano ha causado un incremento en la generación de aguas negras. Cuando estas aguas no son depositadas de manera adecuada ni tratadas se generan problemas de sanidad. Las aguas negras se componen principalmente por materia orgánica, coliformes y sólidos suspendidos; la forma más común de tratar estas aguas es mediante su traslado a plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), donde se realiza el saneamiento de estas. Sin embargo, esto es un proceso costoso para los gobiernos municipales los cuales los cuales son los encargados de realizar el tratamiento de estas aguas. De manera común, en las comunidades se hace el depósito de las aguas negras en fosas sépticas para posteriormente ser enviadas a las PTAR para su depuración, por tal motivo es que en los últimos años se han estado desarrollando técnicas más asequibles.

La remediación es un proceso en el cual son utilizados organismos vivos (plantas, hongos, bacterias) o derivados de estos para minimizar, reducir o eliminar la toxicidad de sustancias nocivas que pueden tener efectos negativos en los seres humanos. Dentro de las técnicas de remediación se encuentra la fitorremediación, en la cual se hace uso de plantas para hacer la eliminación de contaminantes. La fitorremediación tiene varios mecanismos por los que pueden ser disminuidos o eliminados los contaminantes, como lo son: fitoextracción, fitoestabilización, fitodegradación, fitovolatilización, rizofiltración y fitoestimulación. Los procesos de fitorremediación son unas de las técnicas más económicas en comparación de los procesos aplicados en las PTAR.

En la comunidad Ordeña de Barajas, ubicada en el municipio de Pénjamo, Guanajuato, no se cuenta con una fosa séptica en donde se depositen las aguas negras provenientes de las actividades domésticas de los pobladores de dicha comunidad, por lo que estas son descargadas en un canal situado a un lado de la vía de acceso principal de la comunidad, trayendo consigo olores desagradables, además del riesgo que representa el exponer a la población a enfermedades causadas principalmente por microorganismos presentes en estas aguas. Por tal motivo, surge la propuesta de realizar un proceso de fitorremediación para la eliminación y/o reducción de contaminantes en este tipo de aguas. El objetivo de este proyecto radicó en reducir la concentración

de los contaminantes orgánicos presentes en las aguas negras de la comunidad de Ordeña de Barajas mediante la utilización de *Nelumbo nucifera* (Flor de loto). La razón de utilizar y experimentar con esta planta en este tipo de proceso es debido a que se ha reportado que *N. nucifera* es una planta que se ha utilizado para la remoción del 91% de contaminantes de fosforo en aguas residuales domesticas¹, de igual manera se ha usado para la fitorremediación del herbicida metalo-cloro, obteniendo reducciones del 24% en su concentración más alta², también ha mostrado en varios estudios su capacidad para la remoción de distintos metales pesados (As, Zn, Cu, Pb, Ni, Co, Cd)^{3,4}. Lo que demuestra que esta especie vegetativa se puede utilizar para diversos procesos remediativos.

AGUAS GRISES

Las aguas grises son aguas residuales generadas por las actividades domésticas, tales como la lavandería, el lavado de platos, y el baño, que pueden ser recicladas en el lugar para usos como el riego de jardines y humedales artificiales. Las aguas grises representan el 50-80% de las aguas residuales residenciales. Cualquier agua que contiene desechos humanos se considera agua negra. La mayor parte de las aguas grises es más fácil de tratar y reciclar que las aguas negras, debido a los niveles más bajos de contaminantes. Si bien todas las aguas grises contienen microorganismos, los riesgos de salud asociados con las aguas grises de una fuente de viviendas múltiples deben ser considerados de manera diferente a la de una fuente de vivienda única de aguas grises⁵. Entre las sustancias biodegradables presentes en las aguas negras se encuentran los compuestos nitrogenados tales como proteínas, urea, aminoácidos, aminas en un 40%; compuestos no nitrogenados como grasas y jabones en un 10 %, y carbohidratos en un 50 %. La presencia de organismos patógenos, provenientes en su mayoría del tracto intestinal, hace que estas aguas sean consideradas como extremadamente peligrosas, sobre todo al ser descargadas en la superficie de la tierra, subsuelo, o en cuerpos de agua. Es el caso con la presencia de bacterias del grupo entérico que producen enfermedades de origen hídrico como: fiebre tifoidea, paratifoidea, disentería, cólera entre otras⁶, ocasionadas principalmente por bacterias (*Shigellae dysenteriae*, *Salmonella sp.*, *Shigellae sp.*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli Enteroinasiva*, etc.) y virus (Astrovirus, Rotavirus, etc.) presentes en estas aguas residuales⁷.

Fitorremediación

La fitorremediación aprovecha la capacidad de ciertas plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo, aire, agua o sedimentos como: metales pesados, metales radioactivos, compuestos orgánicos y compuestos derivados del petróleo. Estas fitotecnologías ofrecen numerosas ventajas en relación con los métodos fisicoquímicos que se usan en la actualidad, por ejemplo, su amplia aplicabilidad y bajo costo. La fitorremediación, por sí misma, muestra una serie de ventajas y limitaciones en comparación con otras tecnologías convencionales, las fitotecnologías son especialmente útiles para su aplicación en grandes superficies, con contaminantes relativamente inmóviles o con niveles de contaminación bajo, y deben considerarse procesos de recuperación a largo plazo⁸. La aplicación de la fitorremediación tiene limitaciones: la profundidad de penetración de las raíces; la fitotoxicidad en áreas fuertemente contaminadas; los tiempos de proceso pueden ser muy prolongados, con respecto a las demás técnicas de remediación y la biodisponibilidad de los compuestos que siempre limita la captación. Para superar estas limitaciones es indispensable comprender: los mecanismos, las fases que participan en la fitorremediación las interacciones planta-microorganismo⁹.

Flor de loto

La planta *Nelumbo nucifera*, conocida comúnmente como Flor de loto o loto sagrado es una planta acuática y se desarrolla donde el fondo está completamente cubierto de fangos o suciedad (pantanos, charcos, ríos, lagos y presas), es originaria de Asia, se encuentra principalmente en China, Pakistán, India, Nepal, aunque también se puede encontrar en las zonas subtropicales de África, Europa y Norteamérica. Es una planta perenne, con rizomas bastante pronunciados. Cuando la planta ya está madura y ha crecido lo suficiente, la planta se abre para darle paso a la flor de loto. Los climas tropicales y templados son los adecuados para que esta planta se desarrolle. Sus hábitats son en aguas tranquilas de hasta 2.5 m de profundidad como pueden ser: lagunas, estanques, pantanos, campos inundados, humedales, marismas y llanuras de inundación¹⁰. En cuanto al uso de *Nelumbo nucifera* en procesos de remediación, se ha reportado que esta planta es muy efectiva

para la remoción de metales pesados, por ejemplo, se reporta que los rizomas de esta planta pueden acumular 253 ± 12 mg Cd/kg, incluso las plántulas de la flor de loto creciendo en concentraciones de 0,75, 1,0 y 1,25 ppm de sulfato de cadmio mostraron un aumento significativo en la eliminación de Cd de 0.0334-0.121 ppm / semana¹¹. En otro estudio se ha reportado que *Nelumbo nucifera* tiene una gran capacidad para remover As y Sn de suelos y sedimentos contaminados, logrando extraer más de 12.4 kg de Sn y 8099 kg de As por hectárea¹². Además de los metales anteriormente mencionados, también se ha reportado la remoción de Cu, Cr y Pb mediante el uso de *N. nucifera*¹³, esto demuestra que *N. nucifera* puede ser usada como una especie fitorremediadora para metales pesados, en este proyecto en particular, analizaremos la factibilidad de utilizarla para la remoción y/o reducción de contaminantes orgánicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó un muestreo de agua residual en la comunidad de la Ordeña de Barajas municipio de Pénjamo, Guanajuato (Long. 20° 20' 50", Lat. 101° 40' 28"). La toma de las muestras se realizó en base al procedimiento marcado en la norma PROY-NMX-AA-003/3-SCFI-2008¹⁴; se tomó una sola muestra de aguas grises, la cual se recolectó directamente en el tubo en el que son descargadas las aguas al canal, para la muestra testigo se tomó de un sitio en el cual no había la presencia de ningún tipo de contaminación. Se utilizaron nueve semillas de *N. nucifera*, a las cuales se les tallo el episperma para inducir una germinación artificial tal como se muestra en la Fig. 1, el tallado se hace hasta obtener un color café claro, sin llegar a la porción blanca de la semilla (Fig. 2).



Fig. 1. Escarificación de las semillas.



Fig. 2. Semillas germinadas.

Además del muestreo de agua, también se realizó un muestreo de lodos para llevar a cabo los tratamientos de remediación, el muestreo se realizó en base al método establecido en la NMX-AA-132-SCFI-2006¹⁵. El lodo que se tomó se colocó en tinas con capacidad de 230 litros, las cuales se les agrego el agua previamente muestreada, vermiculita y sustrato para plantas acuáticas y plántulas de *N. nucifera*, esto para el establecimiento de los tratamientos (Fig. 3), se usaron dos tinas para los tratamientos y una más para el control.



Fig. 3 Transplante y acomodó de las plántulas.

El monitoreo del tratamiento se realizó semanalmente, durante un periodo de un mes, tiempo tras el cual se tomó una muestra de agua para realizar la comparación de las cantidades iniciales y finales de los parámetros seleccionados (DBO₅, Cloro total, pH, Coliformes totales, Coliformes fecales, *E. coli*), además de lo anterior también se analizó el desarrollo fisiológico de las plantas de *N. nucifera* durante el periodo del tratamiento.

RESULTADOS

Los análisis para cada uno de los parámetros seleccionados se llevaron a cabo antes y después del tratamiento, los resultados se muestran en la Tabla 1, en la cual se indica el método utilizado, los límites máximo permisibles (LMP) para los parámetros analizados además del porcentaje de reducción.

Parámetro	Método analítico	LMP	Concentración inicial	Concentración final	Reducción en la concentración	% de reducción
DBO ₅	NMX-AA-028-SCFI-2001 ¹⁷	200 mg/L	276.93 mg/L	15.16 mg/L	261.77 mg/L	94.52
Cloro total	NMX-AA-SCFI-108-2001 ¹⁸	Reglamento de Protección Ambiental 0.5 mg/L	<0.20 mg/L	0.05 mg/L	0.15 mg/L	75
pH	NMX-AA-008-SCFI-2001 ¹⁹	6.5-8.5 U de pH	7.60 U de pH	8.17 U de pH	+ 0.57 U de pH	+ 5.39
Coliformes totales	CCAYAC-M-004/11 ²⁰	NOM-127-SSA1-1994 ²¹ 2 NMP/100 ml	43,000,000 NMP/100 ml	460 NMP/100 ml	42,999,540 NMP/100 ml	99.99
Coliformes fecales	CCAYAC-M-004/11	NOM-003-ECOL-1997 ²² 240 NMP/100 ml	43,000,000 NMP/100 ml	39 NMP/100 ml	42,999,961 NMP/100 ml	99.99
<i>E. coli</i>	CCAYAC-M-004/11	NOM-122-SSA1-1994 ²³ 0 NMP/100 ml	43,000,000 NMP/100 ml	11 NMP/100 ml	42,999,989 NMP/100 ml	99.99

Tabla 1. Concentraciones iniciales y finales de los parámetros analizados.

Es interesante hacer notar que, en el caso del pH, hubo un aumento en las unidades de pH, esto probablemente se deba al aumento de los iones hidrógeno resultado de la degradación de los compuestos orgánicos presentes en el agua, sin embargo, aunque hay un aumento, el valor de pH aún se encuentra dentro del rango del LMP para pH. En el caso de cloro total no se establece un valor para el LMP en nuestro país, por lo que se realizó la búsqueda de valores de LMP para cloro en otros países, encontrándose solamente el Reglamento de Protección Ambiental de las Islas Mauricio¹⁶, el cual es de 0.5 mg/L, por lo que se tomó como referencia este valor. En cuanto al desarrollo fisiológico, se notó una afectación en el desarrollo de las plántulas, tal como se muestra en las Fig.4 a 8.



A) Muestra testigo

B) Muestra contaminada

Fig. 4 Plántulas de *N. nucifera* el día del trasplante

A) Muestra testigo

B) Muestra contaminada

Fig. 5 Desarrollo de las plantas en la primera semana.



A) Muestra testigo

B) Muestra contaminada

Fig. 6 Desarrollo de las plantas en la segunda semana.



A) Muestra testigo

B) Muestra contaminada

Fig. 7 Desarrollo de las plantas en la tercera semana



A) Muestra testigo

B) Muestra contaminada

Fig.8 Desarrollo de las plantas en la cuarta semana

Con respecto al agua tratada con este procedimiento, también se mostró una notable diferencia, tal como se evidencia en la Fig. 9.



Fig. 9 Muestras de agua, antes y después del tratamiento.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se demuestra que *Nelumbo nucifera* es una especie que ocupa una gran cantidad de nutrientes orgánicos para desarrollarse adecuadamente. *Nelumbo* toma la materia orgánica del agua residual como nutrientes, disminuyendo así significativamente la DBO₅ y la concentración de los demás contaminantes presentes. Las condiciones climáticas no fueron las mejores para el desarrollo de las plantas, debido a que estas se desarrollan mejor en climas tropicales y templados, en cambio en el estado de Guanajuato, en la región suroeste (que es donde se realizó el proceso), el clima es cálido subhúmedo, sin embargo, si se desarrollaron, aunque lentamente, llegando a reducir los contaminantes presentes. El agua tratada no quedó totalmente libre de contaminantes, aunque estos se redujeron significativamente, quedando por debajo o en el umbral de los LMP establecidos en las normas correspondientes, NOM-122-SSA1-1994, NMX-AA-028-SCFI-2001, NMX-AA-008-SCFI-2001, NOM-127-SSA1-1994, NOM-003-ECOL-1997 y el reglamento de protección de las Islas Mauricio. El proceso de fitorremediación mediado por *N. nucifera* se podría mejorar, aumentando la cantidad de plantas por tratamiento y así se podrían reducir incluso al 100% los contaminantes, de igual manera el tiempo de vida de estas pudiera ser mayor y alcanzar una etapa de madurez más alta. Por el tipo de contaminantes que se analizaron y los resultados obtenidos, probablemente el mecanismo de fitorremediación sea una fitodegradación o rizodegradación. Con esto se demuestra que *N. nucifera* puede ser una opción sumamente viable para el tratamiento de aguas residuales con la presencia de una alta carga orgánica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thongtha, S., Teamkao, P., Boonapatcharoen, N., Tripetchkul, S., Techkarnjararuk, S., & Thiravetyan, P. (2014). *Phosphorus removal from domestic wastewater by Nelumbo nucifera Gaertn. and Cyperus alternifolius L.* *Journal of environmental management*, 137, 54-60.
2. Obando, W. S. O. (2012). *Evaluation of Sacred Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) as an Alternative Crop for Phyto-remediation* (Doctoral dissertation, Auburn University).
3. ASHRAF, M. (2013). *Evaluation of Natural Phytoremediation Process Occurring at Ex-Tin Mining Catchment.* *Chiang Mai Journal of Science*, [online] 40(2), pp.198-213. Available at: <http://repository.um.edu.my/28008/1/13-04-04-19ca1%20%281%29.pdf> [Accessed 17 Apr. 2018]
4. Kumar, J. N., Soni, H., Kumar, R. N., & Bhatt, I. (2008). *Macrophytes in phytoremediation of heavy metal contaminated water and sediments in Pariyej Community Reserve, Gujarat, India.* *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(2).
5. Asenjo López, C. (2015). *Tratamiento de aguas grises.* iAgua. Retrieved 17 April 2018, from <https://www.iagua.es/blogs/cristina-assenjo-lopez/tratamiento-aguas-grises>
6. Farias de Marquez, B. (2016). *¿Qué son las aguas negras?* iAgua. Retrieved 17 April 2018, from <https://www.iagua.es/blogs/bettys-farias-marquez/que-son-aguas-negras-0>
7. Moncada, M.A., Campos, V. (2003). *Agua potable para comunidades rurales, reúso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas.* Capítulo 13, 156-167.
8. Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). *Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación.* *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 14(2), 597-612.

9. López-Martínez, S., Gallegos-Martínez, M. E., Pérez Flores, L. J., & Gutiérrez Rojas, M. (2005). *Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas*. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 21(2).
10. Ross, I. (2001). *Nelumbo nucifera*. *Medicinal Plants Of The World*, 2, 353-362. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59259-237-1_19
11. Bandara, J. M. R. S., Wijewardena, H. V. P., & Seneviratne, H. M. M. S. (2010). *Remediation of cadmium contaminated irrigation and drinking water: A large scale approach*. *Toxicology letters*, 198(1), 89-92.
12. Ashraf, M. A., Maah, M. J., & Yusoff, I. (2012). *Assessment of phytoextraction efficiency of naturally grown plant species at the former tin mining catchment*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21(3), 523-533.
13. HAMIDIAN, A. H., NOROUZANIA, H., & MIRZAI, R. (2016). *Phytoremediation efficiency of Nelumbo nucifera in removing heavy metals (Cu, Cr, Pb, As and Cd) from water of Anzali wetland*.
14. PROY-NMX-AA-003/3-SCFI-2008: GUÍA PARA EL MUESTREO DE AGUAS RESIDUALES (2008). México.
15. NMX-AA-132-SCFI-2006: MUESTREO DE SUELOS PARA LA IDENTIFICACION Y LA CUANTIFICACION DE METALES Y METALOIDES, Y MANEJO DE LA MUESTRA (2006). México.
16. Environment Protection (Standards for effluent discharge) Regulations 2003 (G.N. No. 44 of 2003). (2004). Mauritius Islands.
17. NMX-AA-028-SCFI-2001: ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES (DBO5) Y RESIDUALES TRATADAS (2001). México.
18. NMX-AA-108-SCFI-2001: DETERMINACIÓN DE CLORO LIBRE Y CLORO TOTAL - MÉTODO DE PRUEBA (2001). México.
19. NMX-AA-008-SCFI-2011: ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DEL PH - MÉTODO DE PRUEBA (2001). México.
20. CCAYAC-M-004/11: METODO DE PRUEBA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP), DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES Y Escherichia coli (2017). México.
21. NOM-127-SSA1-1994: Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. (2000). México.
22. NOM-003-ECOL-1997: Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público (1997). México.
23. NOM-122-SSA1-1994, Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias. (1994). México.

EFFECTO DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA DE LA LUZ SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE JITOMATE SALADET (*LYCOPERSICUM ESCULENTUM*)

Diana Karina Torres Páramo, Diego Téllez González, Blanca Estela Gómez Luna, Juan Carlos Ramírez Granados

Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Ingeniería en Biotecnología.

RESUMEN

En México el jitomate es uno de los cultivos más populares que tiene gran impacto económico a nivel nacional e internacional por lo que se ha invertido esfuerzo en el desarrollo de las investigaciones para mejorar la producción del fruto hortícola siendo la fotosíntesis un punto de interés para dichas investigaciones. La fotosíntesis es un proceso fundamental para las plantas, a través del cual obtienen energía química utilizando energía lumínica, específicamente del espectro de luz visible (400-780 nm). Este proceso repercute directamente en la biomasa de la planta y por lo tanto, en el rendimiento de un cultivo.

Con el objetivo de determinar experimentalmente el efecto de la radiación sobre el crecimiento de las plantas se obtuvieron 5 grupos de plantas: grupo control irradiado únicamente con luz solar y cuatro grupos que se sometieron a 4 tratamientos de diferente luz (roja, azul, verde y violeta), cada color se obtuvo con una cubierta de papel celofán de color.

El efecto de la radiación se evaluó sobre el incremento de la altura de la planta, número de hojas, producción de biomasa y la presencia de plagas durante un periodo de seis semanas, tomando en cuenta el factor de la temperatura. Los resultados se obtuvieron luego de 5 semanas de tratamiento, mediante un diseño experimental de bloques al azar se determinó que se llegó a la conclusión de que el tratamiento con luz es el mejor prospecto para desarrollar tecnologías para el aumento de los rendimientos.

INTRODUCCIÓN

México es uno de los centros de domesticación más importantes del jitomate, en la actualidad se siembra en 28 estados de los cuales 11 se destacan por la superficie destinada al cultivo, la calidad y el volumen de producción. El precio de tomate nacional e internacional cambia según la variedad (tomate bola, tomate cherry y principalmente tomate saladette) y tecnología usada en la producción, haciendo de la agricultura protegida (invernaderos y uso de malla sombra) la principal fuente de producción; por esta razón en los últimos años la superficie destinada a la agricultura protegida ha ido aumentando a una tasa anual promedio de 30.1 por ciento. Esta modalidad de producción se centra en los estados de Sinaloa, Baja California y San Luis Potosí, sin embargo, ha ido adquiriendo importancia en otros estados en donde se incluye el estado de Guanajuato (Ayala, 2011).

La principal función del empleo de invernaderos y malla sombra es la climatización de los cultivos ante cambios bruscos de temperatura, viento, humedad, lluvia, y para la protección ante flora y fauna nociva y, en algunos casos, de luz excesiva ya que dependiendo de la intensidad y/o longitud de onda de la luz, este determinará la cantidad de azúcares producidos en las hojas durante la fotosíntesis (Ayala, 2011).

La fotosíntesis de manera general es la vía metabólica más importante en las plantas, en esa se transforma la energía solar en energía química para formar polisacáridos a partir de agua y dióxido de carbono liberando oxígeno como producto. La fotosíntesis puede dividirse en dos etapas: a) Las reacciones dependientes de la luz. Se llevan a cabo en la membrana de los tilacoides, en esta los pigmentos fotosintéticos proveen la energía requerida para la transformación de energía luminosa en energía química (se forman moléculas de ATP y NADPH) en esa fase se libera oxígeno como desecho y b) El ciclo de Calvin. Se produce en el estroma y se caracterizan por ser reacciones independientes de la luz. El ciclo de Calvin usa los productos generados en las reacciones dependientes de la luz para fijar el dióxido de carbono y producir polisacáridos.

Es importante destacar el efecto de la luz en aspectos metabólicos y morfológicos de la planta ya que afecta en la tasa fotosintética, el balance hídrico, crecimiento de órganos y tejidos (principalmente los tallos), expansión de las hojas, floración, germinación, entre otros. La luz visible comprende longitudes de onda que van de los 400 a los 700 nm, la radiación que es absorbida por

los vegetales se denomina Radiación fotosintéticamente activa o PAR y representa la cantidad de radiación y el rango de longitudes de onda que son capaces de producir actividad fotosintética, esta radiación es absorbida por diferentes pigmentos foliares: clorofilas a y b, xantofilas, carotenoides y antocianinas (Casierra, 2011). En la tabla 1 se muestran algunos efectos de diferentes longitudes de onda sobre las plantas.

Tabla 1. Efectos de diferentes longitudes de onda sobre las plantas

	λ (nm)	Acciones y efectos	Tipo de fotorreceptor y otras moléculas que absorben la energía lumínica
UV-C	< 280	Mutaciones, daño y muerte celular.	DNA-RNA
UV-B/UV-A	315-400	Acción morfológica; síntesis de pigmentos; daño y muerte celular	Criptocromos y fotorreceptores UV
Violeta -Azul	400-510	Acción fotosintética, fotomorfogénesis, ritmo circadiano, tiempo de floración, fototropismo, movimiento de cloroplastos, apertura de estomas, estimulación de la síntesis de clorofila y carotenos.	Fotosistemas (Clorofilas a y b), criptocromos. Fototropinas
Verde-Amarillo	510-610	Acción reducida sobre la fotosíntesis	Carotenos
Anaranjado-Rojo/Rojo lejano	610-1000	Acción fotosintética, germinación de semillas, tiempo de floración, ritmo circadiano, fotomorfogénesis. Elongación celular	Fotosistemas (clorofilas a y b) fitocromos
Infrarrojo	>1000	Efectos mínimos, pocos estudios	-

Los pigmentos foliares se caracterizan por captar la energía lumínica y de transformarla en energía química mediante la fotosíntesis. Los pigmentos primarios, son los que tienen como finalidad principal la captación de la energía lumínica y además están acompañados de otros pigmentos accesorios, cuya función es por una parte ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios y por otra de servirles como sistemas de protección frente a la luz excesiva.

El pigmento central empleado por las plantas es la clorofila ya que es la principal molécula aceptora de energía, está formada por un anillo de porfirina (cuya función es absorber luz), fitol y una cadena larga de alcohol, se encuentra en la membrana del tilacoide en los cloroplastos y tiene como función absorber preferencialmente la luz violeta, azul y roja; sin embargo, refleja la verde. Los carotenoides y xantofilas son sustancias usadas como pigmentos accesorios de la fotosíntesis, es decir, ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios y por otra parte sirven como sistemas de protección frente a la luz excesiva. Los carotenoides que contienen átomos de oxígeno se les conoce más como xantofilas, los restantes constituyen el grupo de los llamados carotenos. Su color, que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro se encuentra directamente relacionado con su estructura (Casierra, 2011).

Además de pigmentos, las plantas también poseen fotorreceptores que les permiten el monitoreo de su entorno a través de la detección de longitudes de ondas específicas. Por ejemplo, la familia de fotorreceptores llamadas "fotocromos" es capaz de detectar radiación en el rango rojo/rojo lejano (600-750 nm). Los fotorreceptores de la familia de los Criptocromos y Fototropinas son capaces de

detectar la radiación en el rango UV-A/ azul (320-500nm). También existe evidencia de que hay fotorreceptores para la radiación UV-B (282-320 nm), sin embargo, la naturaleza de estos fotorreceptores aún es motivo de investigación (Carrasco, 2009, Meisel, 2011).

Debido a la gran cantidad de procesos en los que la luz ejerce un papel fundamental, existen cada vez más investigaciones y nuevas tecnologías que buscan mejorar los rendimientos de los cultivos haciendo uso de la luz. La nueva tecnología fomenta la estimulación diferencial de algunas respuestas fisiológicas reguladas por la luz tales como la fotosíntesis y la fotomorfogénesis, que incluye efectos sobre la elongación del tallo, expansión foliar, desarrollo de cloroplastos, síntesis de clorofila, y muchos otros metabolitos secundarios, en respuesta a la incidencia de luz azul (400 a 500 nm), roja (600 a 700 nm) y roja lejana (700 a 800 nm), percibidas por los fotorreceptores biológicos (Carrasco, 2009, Meisel, 2011).

Como objetivo principal se buscó demostrar mediante un experimento el efecto de la radiación con longitudes de onda de 400-450 nm (violeta), 450-500 nm (azul), 500-570 nm (verde) y 620-700 nm (rojo), sobre el desarrollo de plantas de jitomate tipo saladette evaluando el incremento en el tallo de las plántulas, número de hojas, la producción de biomasa y la presencia de plagas ya que se ha informado que ciertas longitudes de onda (especialmente las rojas) promueven la aparición de plagas (Mexicano, 2016).

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico, se utilizaron semillas de jitomate variedad saladete (*Lycopersicum esculentum*) y el sustrato para germinación Peat Moss®. A la semana de germinación se establecieron los tratamientos.

El diseño experimental por bloques al azar se formaron 5 grupos en donde cada tratamiento empleó 33 plantas y uno de ellos fue el control que fue irradiado únicamente con luz solar, los 4 tratamientos restantes fueron irradiados con longitudes de onda diferentes (luz roja, luz azul, luz verde y luz violeta), en donde, con ayuda de una cubierta de celofán (de aproximadamente 2m), se obtuvieron los colores afines a los tratamientos, cada tratamiento requirió una base metálica (alto: 30 cm, largo: 80 cm, ancho: 50 cm) que sirvió como soporte a la cubierta de celofán, Figura 1. En conjunto estas sirvieron como una barrera contra el impacto del viento y un poco contra las plagas, aunque en la parte inferior se dejó un espacio sin la cubierta de celofán para permitir el paso de los gases fundamentales para la fotosíntesis como el dióxido de carbono y el oxígeno que es un producto. La finalidad de esto fue evaluar el efecto de éstos sobre la altura de la planta, número de hojas, producción de biomasa y la presencia de plagas, tomando en cuenta el factor de la temperatura. A la semana 5 se tomaron las variables de altura, número de hojas, peso fresco, peso seco y biomasa.

RESULTADOS

Uno de los factores a evaluar fue la presencia de plagas, las cuales se hicieron presentes desde la semana 1 del tratamiento, apareciendo en mayor cantidad en el control y en el tratamiento con luz roja. Por otro lado, el tratamiento con luz azul fue el que tuvo una menor presencia de plaga. La plaga mayoritaria fue de mosca blanca, presente en todos los tratamientos, además se observaron trips en el grupo control y el tratamiento con luz verde (Figura 1).

Al finalizar el experimento se analizaron las plantas por tratamiento con el fin de obtener los datos finales de altura de tallo, hojas producidas, longitud de raíz, peso fresco y peso seco de muestras tomadas al azar de los grupos de plantas.

Los datos fueron analizados bajo un diseño experimental de bloques al azar, utilizando el programa InfoStat (versión libre), seleccionando la comparación LSD de Fisher con una $\alpha=0.05$. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 2 y figura 3.



Figura 1. Presencia de mosca blanca en las hojas de una planta bajo el tratamiento con luz roja.

Figura 2. Tratamientos al finalizar el experimento. Se observa la diferencia de alturas y la cantidad de hojas entre tratamientos.

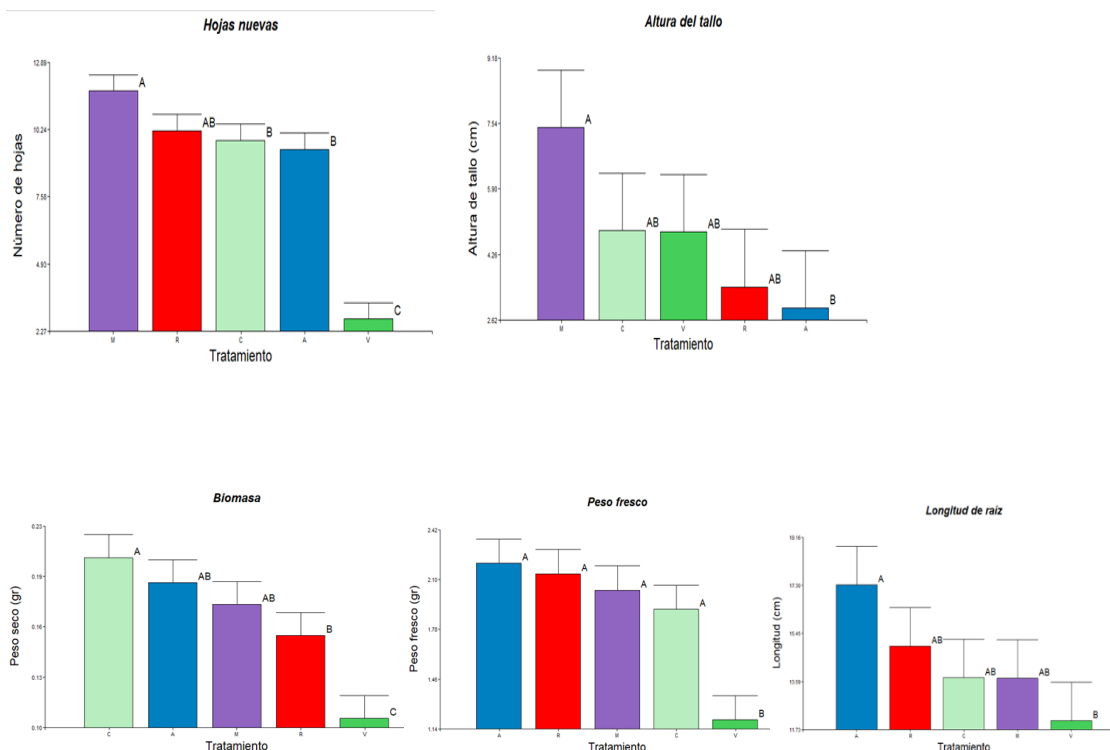


Tabla 2. Resultados obtenidos al analizar los datos finales. Se muestran los promedios de cada variable y su grupo. Además, se observan las categorías de los datos, que nos permiten comparar los tratamientos.

Tratamiento	Altura de tallo cm	Hojas	Longitud de raíz cm	Peso fresco g	Biomasa g
Control	4.87 AB	10 B	13.73 AB	1.90 A	0.207 A
Morado	7.45 A	12 A	13.72 AB	2.03 A	0.176 AB
Azul	2.92 B	9 B	17.33 A	2.20 A	0.190 AB
Verde	4.83 AB	3 C	12.07 B	1.19 B	0.102 C
Rojo	3.46 AB	11 AB	14.9 AB	2.13 A	0.156 B

Los valores son promedio de 33 plantas en cada tratamiento, las letras indican diferencia entre tratamientos. Control es exposición completa de luz.

Figura 3. Gráficas de efecto de las diferentes longitudes de onda en desarrollo de plantas de jitomate.



De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 2, el tratamiento con luz morada fue el que mostró una mayor efectividad. Esto se puede observar por los grupos de clasificación marcados con las letras A, B y C, siendo la letra A la correspondiente a los mejores resultados.

A continuación, se discutirá el porqué de la obtención de los resultados antes presentados.

Grupo control

El grupo control fue mantenido a condiciones normales de temperatura y humedad relativa, y fue irradiado solamente con luz solar, por lo que representa al cultivo en condiciones de campo y es utilizado como comparativo de los otros tratamientos.

Este grupo fue atacado por una gran cantidad de plaga, incluyendo mosca blanca, trips y larvas.

Grupo irradiado con luz morada

La luz morada corresponde a una longitud de onda de 400-450 nm. En esta longitud de onda, las plantas pueden absorber luz debido a los picos de absorción de la clorofila, además de la presencia de fotorreceptores como los criptocromos.

Al absorber más luz, la planta fue capaz de producir una gran cantidad de carbohidratos, que fueron usados para su crecimiento observado como gran cantidad de hojas y una mayor altura de tallo.

También cabe la posibilidad de que la planta produjera una mayor cantidad de hojas y un tallo más largo por la baja iluminación. El incrementar el área foliar es un mecanismo de adaptación de las plantas en condiciones de baja iluminación, a través del cual pueden tener una mayor área captadora de luz.

Este grupo fue invadido por la plaga de la mosca blanca, pero está reportado que puede ser susceptible a otras variedades de plaga, ya que los insectos son atraídos por este tipo de luz. Esto es debido a que la luz violeta forma parte importante en la búsqueda de alimento, navegación y selección de pareja en animales invertebrados aéreos y terrestres.

Dicho esto, y observando los resultados, podemos decir que el grupo con luz morada fue el más efectivo de los 4 y podría utilizarse en campo si se puede combatir la desventaja de las plagas.

Grupo irradiado con luz Verde

La luz verde corresponde a una longitud de onda de 500-570 nm. En esta longitud de onda las plantas verdes no son capaces de absorber una gran cantidad de luz, ya que se refleja en las hojas. Por lo tanto, si la planta no es capaz de captar luz, tiende a aumentar su altura para buscar los lugares más iluminados. Debido a este fenómeno, las plantas bajo este tratamiento fueron de las más altas. Al no ser capaces de encontrar luz utilizable, las plantas produjeron pequeñas cantidades de carbohidratos, lo que limitó su producción de hojas y de raíz.

Este grupo también fue invadido por plagas. Esto puede ser debido a que las plantas que no producen lo suficiente para su supervivencia mantienen niveles de defensa más bajos que otras que pueden producir metabolitos secundarios.

Grupo irradiado con luz Azul

La luz azul corresponde a longitudes de onda de 450-500 nm. En esta longitud de onda la planta es capaz de absorber luz debido a que uno de los picos máximos de absorción de la clorofila se encuentra en este rango, además de la presencia de fotorreceptores como los criptocromos y las fototropinas. Por lo tanto, la planta es capaz de absorber una gran cantidad de luz y así, sintetizar carbohidratos para aumentar de tamaño.

Esto es observable en los resultados, ya que el tratamiento azul obtuvo buenos resultados, sin embargo, no son los esperados. Esto puede deberse a que el color del papel celofán utilizado no daba la longitud de onda exacta para que esta ventaja pudiera ser notoria.

Este grupo fue el menos atacado por plagas. Se ha reportado que la luz azul ejerce un efecto de fototaxia negativa en insectos, es decir, los repele.

Grupo irradiado con luz roja

La luz roja corresponde a longitudes de onda de 620-700 nm. En esta longitud de onda la planta es capaz de absorber una gran cantidad de luz debido a la presencia de un pico de absorción máximo de la clorofila, además de la presencia de fotorreceptores como los fitocromos.

Por lo tanto, la planta es capaz de aumentar su tasa fotosintética. Según la hipótesis, este grupo debió dar los mejores resultados, sin embargo, no sucedió así. Esto puede deberse a la presencia constante de plagas en este grupo, debido a que la luz roja ejerce fototaxia positiva en los insectos. Al estar bajo un ataque de plaga, el cultivo reduce su rendimiento por la pérdida de hojas y el estrés causado a la planta.

La longitud de onda usada para irradiar un cultivo influye en su rendimiento y en los diferentes parámetros medidos. Con estos resultados, podemos llegar a la conclusión de que el tratamiento con luz morada ofrece ventajas respecto a los otros, sin embargo, trae consigo problemas de plagas, al igual que con el tratamiento con luz roja. Por lo tanto, la alternativa más factible es utilizar luz azul para incrementar los rendimientos por sobre el grupo control, con la ventaja de presentar un menor número de plagas. Sin embargo, es importante continuar con los experimentos hasta obtener el producto de interés para así ver el efecto directo sobre el rendimiento de la especie que se vende.

También cabe la posibilidad de que la planta produjera una mayor cantidad de hojas y un tallo más largo por la baja iluminación. El incrementar el área foliar es un mecanismo de adaptación de las plantas en condiciones de baja iluminación, a través del cual pueden tener una mayor área captadora de luz.

Este grupo fue invadido por la plaga de la mosca blanca, pero está reportado que puede ser susceptible a otras variedades de plaga, ya que los insectos son atraídos por este tipo de luz. Esto es debido a que la luz violeta forma parte importante en la búsqueda de alimento, navegación y selección de pareja en animales invertebrados aéreos y terrestres.

Dicho esto, y observando los resultados, podemos decir que el grupo con luz morada fue el más efectivo de los 4 y podría utilizarse en campo si se puede combatir la desventaja de las plagas.

Grupo irradiado con luz Verde

La luz verde corresponde a una longitud de onda de 500-570 nm. En esta longitud de onda las plantas verdes no son capaces de absorber una gran cantidad de luz, ya que se refleja en las hojas. Por lo tanto, si la planta no es capaz de captar luz, tiende a aumentar su altura para buscar los lugares más iluminados. Debido a este fenómeno, las plantas bajo este tratamiento fueron de las

más altas. Al no ser capaces de encontrar luz utilizable, las plantas produjeron pequeñas cantidades de carbohidratos, lo que limitó su producción de hojas y de raíz.

Este grupo también fue invadido por plagas. Esto puede ser debido a que las plantas que no producen lo suficiente para su supervivencia mantienen niveles de defensa más bajos que otras que pueden producir metabolitos secundarios.

Grupo irradiado con luz Azul

La luz azul corresponde a longitudes de onda de 450-500 nm. En esta longitud de onda la planta es capaz de absorber luz debido a que uno de los picos máximos de absorción de la clorofila se encuentra en este rango, además de la presencia de fotorreceptores como los criptocromos y las fototropinas. Por lo tanto, la planta es capaz de absorber una gran cantidad de luz y así, sintetizar carbohidratos para aumentar de tamaño.

Esto es observable en los resultados, ya que el tratamiento azul obtuvo buenos resultados, sin embargo, no son los esperados. Esto puede deberse a que el color del papel celofán utilizado no daba la longitud de onda exacta para que esta ventaja pudiera ser notoria.

Este grupo fue el menos atacado por plagas. Se ha reportado que la luz azul ejerce un efecto de fototaxia negativa en insectos, es decir, los repele.

Grupo irradiado con luz roja

La luz roja corresponde a longitudes de onda de 620-700 nm. En esta longitud de onda la planta es capaz de absorber una gran cantidad de luz debido a la presencia de un pico de absorción máximo de la clorofila, además de la presencia de fotorreceptores como los fitocromos.

Por lo tanto, la planta es capaz de aumentar su tasa fotosintética. Según la hipótesis, este grupo debió dar los mejores resultados, sin embargo, no sucedió así. Esto puede deberse a la presencia constante de plagas en este grupo, debido a que la luz roja ejerce fototaxia positiva en los insectos. Al estar bajo un ataque de plaga, el cultivo reduce su rendimiento por la pérdida de hojas y el estrés causado a la planta.

La longitud de onda usada para irradiar un cultivo influye en su rendimiento y en los diferentes parámetros medidos. Con estos resultados, podemos llegar a la conclusión de que el tratamiento con luz morada ofrece ventajas respecto a los otros, sin embargo, trae consigo problemas de plagas, al igual que con el tratamiento con luz roja. Por lo tanto, la alternativa más factible es utilizar luz azul para incrementar los rendimientos por sobre el grupo control, con la ventaja de presentar un menor número de plagas. Sin embargo, es importante continuar con los experimentos hasta obtener el producto de interés para así ver el efecto directo sobre el rendimiento de la especie que se vende.

CONCLUSIONES

Hay diversos factores de estrés ambiental que pueden influenciar en el crecimiento y desarrollo de las plantas como la temperatura, la luz solar recibida y la cantidad de agua proporcionada; aunque estas especies vegetales no responden de forma homogénea aun estando en el mismo tratamiento. Esto se pudo observar en los diferentes datos obtenidos del experimento donde hay plantas que difieren en crecimiento con respecto a las otras expuestas al mismo color de celofán.

Así mismo, se logró ver que el uso de un tipo de luz para irradiar cultivos es una alternativa factible y limpia para incrementar los rendimientos de cultivo de una planta tan importante para México y a nivel mundial como lo es el jitomate por los resultados observados, ya que se obtuvieron mejores datos de biomasa de la planta y crecimiento en general que en el control irradiado sólo por luz solar.

BIBLIOGRAFÍA

1. F. Casierra, "Efecto de la exposición del semillero a coberturas de colores sobre el desarrollo y productividad del brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)". *Agronomía Colombiana*, Vol 27, 1, (2009), pp. 49-55.
2. F. Ayala, "Crecimiento y rendimiento de tomate en respuesta a radiación solar transmitida por mallas sombra". *Terra Latinoamericana*, Vol, 29, 4, (2011), pp. 403-410.
3. L. Mexicano, "Cambios Morfológicos Producidos por Tratamientos Ópticos en las Planta" Tesis, Universidad de Guanajuato, (2016), p. 70.
4. L. Carrasco-Ríos, "Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas". *Idesia*, (2009), pp. 59-76.

5. F. Casierra-Posa, "Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa afectadas por la calidad de luz: Implicaciones agronómicas". U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, (2011), pp. 43-53.
6. L. Meisel, "Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas". En F. Squeo, & L. Cardemil, Fisiología Vegetal. La Serena: Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile, (2011).
7. M. Shockley, "Insect Vision: Ultraviolet, Color, and LED Light", University of Georgia Department of Entomology, Georgia, (2011).

EFFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS Y TIEMPOS DE COCCIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS EN FLOR COMESTIBLE DE GASPARITOS (*ERYTHRINA AMERICANA*)

Ángel Ramón Flores Sosa¹, Frineth de la Luz Limón Aguilera², Vicente Velásquez Melgarejo², Irma Patricia Polanco Medina³, Armando J. Martínez-Chacón⁴, Rubí Viveros Contreras⁵, Elia Nora Aquino Bolaños¹

¹Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas, Maestría en Ciencias Alimentarias, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México.

²Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México.

³Universidad Veracruzana, Facultad de Nutrición, Médicos y Odontólogos S/N, Unidad del Bosque, Xalapa, 91017, Veracruz, México.

⁴Universidad Veracruzana, Instituto de Neuroetología, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México.

⁵CONACyT-Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas, Maestría en Ciencias Alimentarias, Dr. Rafael Sánchez Altamirano S/N, Industrial Animas, Xalapa, 91192, Veracruz, México.

RESUMEN

En México, una de las flores comestibles de mayor consumo son los gasparitos (*Erythrina americana*). Además de sus compuestos bioactivos, el gasparito es una flor valorada por las características organolépticas que imparte a los platillos en los que se utiliza. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del método de cocción (escaldado, vapor y horneado) y tiempo de cocción (3, 5 y 10 min) sobre sus características fisicoquímicas y organolépticas. El contenido de sólidos solubles incrementó con el proceso de cocción de 13.47 °Brix (control) a 15.06 y 31.80 °Brix en vapor y horneado, respectivamente. Referente al tiempo de cocción el horneado presentó los valores más altos que van desde 15.20 °Brix a los 3 min de cocción y hasta con un máximo de 24.23 °Brix a los 10 min. El pH incrementó después de 3 min para el cocimiento por vapor y horneado y conforme incrementó el tiempo de cocción éste fue disminuyendo; mientras que la mayor acidez titulable se presentó en horneado y 10 min de cocción (10.95 g ác. cítrico/100 g tf) y el menor valor fue para la cocción por vapor a los 10 min (g ác. cítrico/ 100 g tf). Respecto a los parámetros de color evaluados por lo general los valores mayores se presentaron en el método de cocción horneado, con respecto al tiempo de cocción el parámetro a^* fue el único que mostró diferencia ($p > 0.05$) entre los tres tiempos de cocción evaluados. El método de cocción y el tiempo influyeron en el contenido final de las características fisicoquímicas y parámetros de color de la flor de gasparito, siendo el tratamiento por horneado durante 3 min el que conserva en su mayoría sus características fisicoquímicas evaluadas con respecto al control.

INTRODUCCIÓN

Durante siglos las flores comestibles han formado parte de la nutrición humana, siendo descritas en la literatura antigua (Rob O. *et al.*, 2012). Contribuyen al mejoramiento nutricional de los alimentos, aportando sustancias biológicamente activas como proteínas, vitaminas A, C, riboflavina, niacina, minerales como calcio, fósforo, hierro y potasio beneficiando la salud de quien las consume (Lara *et al.*, 2013). La flor de gasparito (*Erythrina americana*), es utilizada en México principalmente como árbol ornamental, árbol de sombra en cultivos de café y cacao, y como abono y alimento para animales (García *et al.*, 2001). Su importancia radica en que su floración coincide con la Cuaresma, época en la que las flores se comercializan en los mercados. También se les conoce como carne de cuaresma, gasparito, colorín o zumpantle (Ordoñez & Pardo, 1982; García, 2001), se consume en ensaladas, sopas y se mezcla con ingredientes como huevo (Mapes y Basurto, 2016). Los pétalos se extraen con lo que disminuye el contenido de sustancias tóxicas como β -eritroidinas y se evita el sabor amargo (Sotelo *et al.*, 2007; García *et al.*, 1996), posteriormente se hierven en agua y se retiran del fuego con el primer hervor (Ordoñez, 2014).

Uno de los principales atributos que las flores comestibles brindan a los platillos es su color y sabor, el cual puede influir en las preferencias de su consumo (Kelley *et al.*, 2002). Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes métodos de cocción empleados en la cocina

tradicional mexicana en las características fisicoquímicas de la flor de gasparito (*Erythrina americana*).

PARTE EXPERIMENTAL

Material Biológico

Se utilizaron gasparitos (*Erythrina americana*) cosechados en el municipio de Emiliano Zapata, Veracruz ubicado en una altitud de 860 m.s.n.m a una longitud de 96,808611 y latitud 19,428611. Se seleccionaron aquellas flores que presentaban la misma coloración y libres de daño mecánico.

Métodos de cocción

Escaldado

Se pesaron 15 g de flor de gasparito y se sumergieron en un litro de agua a 94 °C durante 3, 5 y 10 min. Posteriormente se les retiró del agua y se colocaron inmediatamente en un baño de agua a 6 °C para detener el proceso de cocción. Se eliminó el exceso de agua y se realizaron los análisis correspondientes.

Vapor

Se colocaron 15 g de flor de gasparito en una vaporera digital (Hamilton Beach) con capacidad de 5.2 litros a una temperatura de 85 °C. Posteriormente transcurridos 3, 5 y 10 min fueron retirados y sumergidos en un baño de agua a 6 °C para detener el proceso de cocción. Enseguida se retiró el exceso de agua y se realizaron los análisis.

Horneado

Se colocaron 50 g de gasparitos en un horno eléctrico convencional a 180 °C en charolas cubiertas con papel aluminio. Finalizada la cocción, las charolas se colocaron en una cama de hielo para detener el proceso. Cada método de cocción se realizó por un tiempo de 3, 5 y 10 min y se utilizó la flor de gasparito en fresco como control.

Preparación del extracto

Se tomaron 3.0 g de la flor de gasparito tratada, así como en estado fresco, los cuales fueron homogenizados (DAIHA-Brand HG-IS-A, Gangwan, Korea) a 50 rpm por 30 s con 50 ml de agua destilada y posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm, 10 °C y 20 min (Hettich zentrifuge, Universal 32R, Tuttlingen, Alemania).

MÉTODOS

Color

El color de las flores se evaluó mediante un espectrofotómetro de sólidos (Konica Minolta, modelo CM-2610 d). Doce pétalos de flor fueron colocados en una placa de cristal (5 cm de diámetro, 1 cm de altura) cuidando que el recipiente estuviera completamente cubierto con la muestra. Para esta determinación de registraron los parámetros L^* , a^* y b^* , con los cuales se calculó la cromaticidad ($C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$) y ángulo de matiz ($h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$) (McGuire, 1992).

Sólidos Solubles Totales

Para el análisis de sólidos solubles totales se colocaron dos gotas del extracto acuoso directamente sobre el lente de un refractómetro digital (ATAGO, PR-32, Tokyo, Japan) que se calibró previamente con agua destilada. Los resultados se multiplicaron por la dilución y se expresaron como °Brix.

Humedad

La determinación de humedad se realizó colocando un gramo de la muestra en una termobalanza WIM-Systems, modelo WMB-50G-3 y se registraron las lecturas finales de porcentaje de humedad y materia seca.

pH

El pH y acidez titulable fueron determinados de acuerdo con el método de la AOAC (1990). El pH se midió directamente con un potenciómetro (OAKTON, 510, Vernon hills, USA) previamente calibrado con soluciones amortiguadoras pH 4 y 7. Se tomó una alícuota de 10 ml del extracto acuoso y se añadieron tres gotas de fenolftaleína al 1% (p/v), como indicador y se tituló con una solución de NaOH 0.1 N hasta llegar a un vire de transparente a rosa y un pH de 8.2. Los resultados fueron calculados con la Ec. 1 y se expresaron como g de ác. cítrico por cada 100 g de muestra.

$$gEA_c 100 g^{-1} = \frac{(mL \text{ gastados})(NAOH 0.01 N)(0.0064 \text{ mEq ácido cítrico})}{\text{Concentración extracto } \frac{g}{mL}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

RESULTADOS

Métodos de cocción

El tratamiento con mayor porcentaje de sólidos solubles totales respecto al control (13.47 °Brix) fue el horneado (31.8 °Brix), seguido del vapor (15.06 °Brix) y escaldado (7.84 °Brix) (Cuadro 1), esto es debido a la disminución del contenido de agua por este método de cocción que llevó a la concentración de solutos.

En el caso del pH solo se presentaron diferencias significativas en el vapor (5.85) respecto a los otros tratamientos y control (Cuadro 1).

Para la acidez titulable los tratamientos que presentaron diferencia respecto al control fueron el vapor (4.43) y escaldado (5.07). En el parámetro de color L* el vapor mostró un valor de 45.75 y horneado 47.05, sin diferencia entre estos tratamientos, el menor valor fue observado en el escaldado (35.57). El parámetro color a* no mostró diferencia entre los métodos de escaldado y vapor, en el parámetro color b* los tratamientos el vapor y horneado no presentaron diferencia. Para la cromaticidad C* todos los tratamientos presentaron disminución respecto al control en los tratamientos de vapor (11.05) y escaldado (11.25) seguidos del horneado (12.93). Por último, para el ángulo de matiz h° los valores más altos fueron los registrados en el tratamiento de vapor (25.05) seguido del horneado (20.72), todos los métodos de cocción presentaron diferencia respecto al control en este parámetro.

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos en los diferentes métodos de cocción en la flor de gasparito (*Erythrina Americana*)

Método de cocción					Color				
	SST	pH	Acidez titulable	Humedad	L*	a*	b*	c*	h*
Control	13.47 ^b	5.73 ^a	7.55 ^b	89.47 ^c	52.49 ^c	19.94 ^c	11.77 ^b	23.18 ^c	30.31 ^c
Escaldado	7.84 ^a	5.74 ^a	5.07 ^a	91.90 ^d	35.57 ^a	10.61 ^a	3.66 ^a	11.25 ^a	18.79 ^a
Horneado	31.80 ^d	5.78 ^a	6.84 ^b	53.49 ^a	47.05 ^b	12.05 ^b	4.60 ^a	12.93 ^b	20.72 ^{ab}
Vapor	15.06 ^c	5.85 ^b	4.43 ^a	84.72 ^b	45.75 ^b	9.92 ^a	4.66 ^a	11.05 ^a	25.05 ^b

Media (n=4). Valores en la misma columna con distintas letras indican diferencias significativas (P<0.05).

Respecto al color, en el parámetro L* todos los tiempos de cocción presentaron diferencia comparadas con el control (52.49), sin embargo, pero no hubo diferencia entre los procesos de cocción. Por otro lado, color a* fue diferente en 5 (10.17) y 10 minutos (11.21). Los parámetros de color b*, c* y h* no mostraron diferencia entre los distintos tiempos de cocción evaluados (3, 5 y 10 min).

Tiempos de cocción

El tiempo de cocción que presentó el mayor valor de sólidos solubles totales fue de 10 min (24.23 °Brix), seguido de 3 min (15.20 °Brix) y por último 5 min (15.27 °Brix) (Cuadro 2). Para el pH el único tiempo que presentó diferencia respecto al control (5.73) fue el de 3 min (5.87). En la acidez titulable los tiempos de 3 y 5 min disminuyeron sus valores respecto al control (7.55). Para la humedad los tiempos de 3 min (82.87) y 5 min (82.94), no mostraron diferencia entre ellos, y como era de esperarse la mayor disminución de humedad se registró con 10 minutos de cocción independientemente del método.

En los parámetros de color, para el caso L* todos los tiempos de cocción presentaron diferencia comparados con el control (52.49), sin embargo, no fueron deferentes entre sí. Por otro lado, color a* tuvo diferencia en 5 min (10.17) y 10 min (11.21). Los parámetros de color b*, c* y h* no presentaron diferencia entre los distintos tiempos de cocción evaluados (3, 5 y 10 minutos).

Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos en los diferentes tiempos de cocción de la flor de gasparito (*Erythrina Americana*)

Tiempo de cocción					Color				
	SST	pH	Acidez titulable	Humedad	L*	a*	b*	c*	h*
0 minutos	13.47 ^a	5.73 ^a	7.55 ^b	89.4750 ^c	52.49 ^b	19.94 ^c	11.77 ^b	23.18 ^b	30.31 ^b
3 minutos	15.20 ^b	5.87 ^b	4.69 ^a	82.87 ^b	43.83 ^a	11.20 ^{ab}	4.07 ^a	11.94 ^a	19.77 ^a
5 minutos	15.27 ^b	5.78 ^a	4.49 ^a	82.94 ^b	43.52 ^a	10.17 ^a	4.57 ^a	11.25 ^a	24.29 ^a
10 minutos	24.23 ^c	5.72 ^a	7.17 ^b	64.30 ^a	41.03 ^a	11.21 ^b	4.28 ^a	12.04 ^a	20.49 ^a

Media (n=4). Valores en la misma columna con distintas letras indican diferencias significativas (P<0.05).

Interacción métodos de cocción y tiempo de cocción sobre los parámetros fisicoquímicos de la flor de gasparito (*Erythrina Americana*)

Sólidos solubles totales

En la Figura 1 se muestra la interacción entre los diferentes métodos y tiempos de cocción con respecto a los sólidos solubles totales, observándose el mayor incremento en el método de horneado.

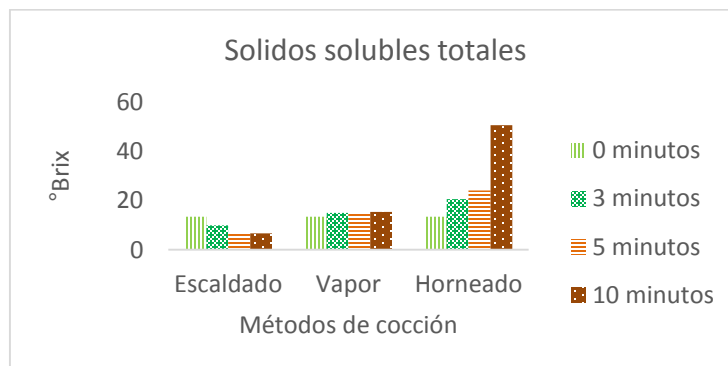


Figura 1. Cambios en la concentración de sólidos solubles totales en flor de gasparito (*Erythrina Americana*)

pH

La Figura 2 presenta la interacción entre los diferentes métodos y tiempos de cocción con el pH, por lo general el escaldado fue el que presentó los valores más bajos de pH, siendo el mínimo a los 3 min de cocción.

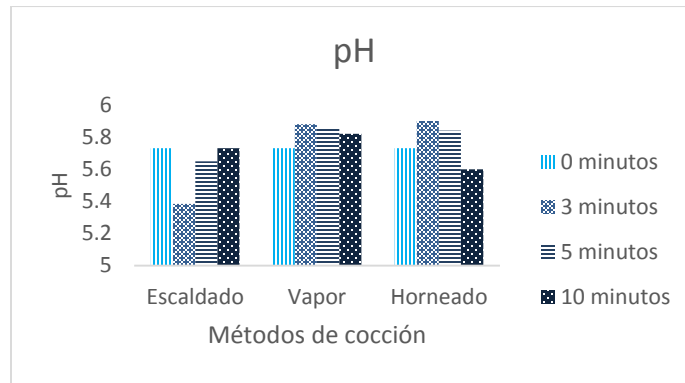


Figura 2. Cambios en el pH de flor de gasparito (*Erythrina Americana*)

Acidez titulable

En la Figura 3 se presenta la interacción del método de cocción con el tiempo. El tratamiento horneado y tiempo de 10 min presentó la mayor acidez. El horneado es una técnica de cocción que disminuye la actividad de agua en los alimentos, degradando compuestos como los carbohidratos poliméricos (sustancias pépticas y hemicelulosa) aumentando al mismo tiempo el contenido de azúcares simples, reflejándose en el aumento de sólidos solubles totales y al mismo tiempo acidez titulable cómo es posible observar en las Figuras 1 y 3. Generalmente, un incremento en estos compuestos resulta en un correspondiente aumento en la intensidad del sabor (Malundo *et al.*, 1995). Galicia *et al.* en el año 2007 reportaron un aumento en la acidez titulable en flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L*) después de 15 min de cocción, sin embargo, a diferencia del presente estudio el único método que emplearon fue ebullición.

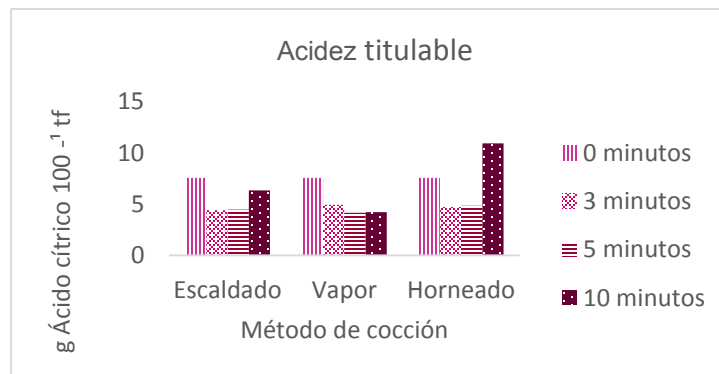


Figura 3.- Cambios en la concentración de acidez titulable en flor de gasparito (*Erythrina Americana*)

Humedad

García *et al.* (1996) reportaron un porcentaje de humedad en la flor de gasparito de 90.30%, valores muy cercanos al reportado en este estudio para el grupo control de 89.47%. Después de la aplicación de los diferentes métodos de cocción y tiempos, por lo general este valor humedad disminuyó, siendo el método de horneado durante 10 min el tratamiento que presentó mayor pérdida de agua como se puede observar en la Figura 4. Esto se debe a que el método de cocción horneado produce la pérdida de agua en el alimento y entre mayor sea el tiempo de exposición mayor será la pérdida.

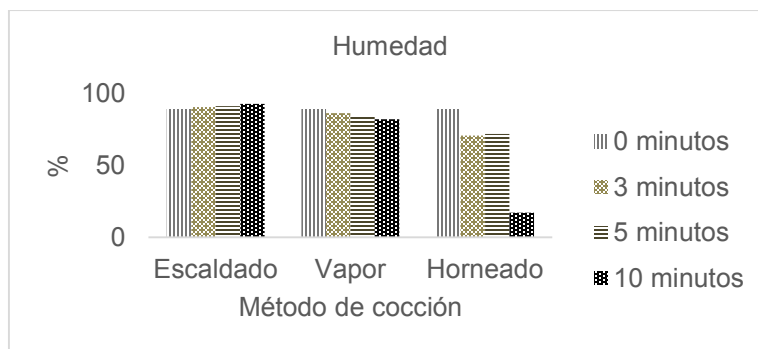


Figura 4. Cambios en la concentración de sólidos solubles totales en flor de gasparito (*Erythrina Americana*)

CONCLUSIONES

En este estudio las flores de gasparito fueron sometidas a diferentes métodos de cocción (escaldado, vapor y horneado) y a diferentes tiempos de cocción (3, 5 y 10 min) en las cuales se evaluaron los efectos de tiempo y método de cocción en sus parámetros fisicoquímicos. Como se mencionó anteriormente lo más importante para el consumidor al momento de elegir un alimento, son las características fisicoquímicas y funcionales de éstos. En la cocina tradicional mexicana las flores de gasparito por lo regular se consumen tras el método de cocción escaldado. Es importante mencionar que emplear una técnica de cocción en esta flor es importante, ya que, esta variedad de planta presenta un alto contenido de alcaloides, específicamente eritroidina, la cual tienen mayor presencia en la semilla de la planta y se asocia con la paralización de los nervios motores en el ser humano. Finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos el método de cocción y el tiempo, influyeron en las características fisicoquímicas y parámetros de color de la flor de gasparito, siendo el tratamiento por horneado durante 3 min el que conserva en mayor proporción sus características fisicoquímicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. O. Rop, J. Mlcek, T. Jurikova, J. Neugebauerova & J. Vabkova, Edible flowers a new promising source of mineral elements in human nutrition. *Molecules*, Vol. 17,6, 2012, pp. 6672-6683.
2. E. Lara, P. Osorio, A. Jiménez, S. Bautista. Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol. 63, 3, 2013, pp. 197-207.
3. R. García, M. Soto, & H. Vibrans, *Econ Bot.*, Vol. 55, 3, 2001 pp. 391-400.
4. M. Ordoñez & J. Pardo. Estudio etnobotánico de tres especies de flores comestibles en la ciudad de Xalapa, Veracruz. *Biotica* Vol. 7,2, 1982 pp. 305-321.
5. C. Mapes, F. Basurto. Biodiversity and Edible Plants of Mexico. In: Lira R., Casas A., Blancas J. (eds) *Ethnobotany of Mexico*. Ethnobiology. (Springer, New York, NY, 2016)
6. A. Sotelo, S. López, S. & F. Basurto. *Plant Foods Hum Nutr.* Vol. 62, 3, 2007 pp. 133-138.
7. K. Kelley, B. Behe B, J. Biernbaum, K. Combinations of colors and species of containerized edible flowers: Effect on consumer preferences. *Hortscience.*; Vol. 37, 1, 2002, pp. 218-221.
8. R. McGuire, Reporting of objective color measurements. *Horticultural Science*. Vol. 27, 1992 pp. 1254-1255.
9. T. Malundo, R. Shewfelt, J. Scott. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 6, 1995, pp. 103-110.
10. L. Galicia, Y. Salinas, B. Espinoza, C. Sánchez. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada *Revista Chapingo Serie Horticultura* Vol. 14, 2, 2008, pp. 121-129.

11. R. García, B. Lucas, M. Zendejas, M. Soto, M. Martínez, A. Sotelo. Variation of Total Nitrogen, Non-protein Nitrogen Content, and Types of Alkaloids at Different Stages of Development in *Erythrina americana* Seeds J. Agric. Food Chem. Vol. 44, 1996, pp. 2987-2991

VARIACIÓN GENÉTICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN VACAS LECHERAS DEL ESTADO DE JALISCO

Martha Alicia Castañeda Vazquez¹, Erika Patricia Salas Castañeda¹, Hugo Castañeda Vazquez¹, Francisco Javier Padilla Ramírez², José Alberto Camacho Palafox², Carlos Bedolla Cedeño³

¹Laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, ²Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria, CUCBA, Universidad de Guadalajara, ³Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

Un problema frecuente en los sistemas de producción láctea es la mastitis bovina, la cual ocasiona disminución en la producción y calidad de la leche. *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno principal de ésta enfermedad, se propaga fácilmente y posee una gran cantidad de genes que le confieren sus características patogénicas.

Los estudios de tipificación genética basados en la variabilidad genética de la bacteria proporcionan datos importantes para el control de su diseminación. Mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE) se obtiene una buena representación de todo el cromosoma bacteriano, es una técnica de genotipificación utilizada para separar moléculas de ADN genómico completo después de una macrorestricción. El objetivo del presente trabajo fue determinar la variación genética de *S. aureus* de vacas lecheras del estado de Jalisco. Se muestrearon 335 vacas de 27 establos de 10 municipios de Jalisco (1,325 muestras de leche). La identificación de cepas de *S. aureus* se realizó en el Laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular del CUCBA de la Universidad de Guadalajara mediante las características en cultivo y pruebas bioquímicas y la comprobación molecular por PCR. Para determinar la variación genética se utilizó la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE).

En los resultados se registró prevalencia de *S. aureus* en 9.8% del total de las muestras. Se obtuvo un porcentaje de similitud genética del 85.1% y con variación genética del 14.9%. Las 32 cepas analizadas se agruparon en 12 perfiles genéticos con 95% o más de similitud. Los resultados obtenidos con las cepas aisladas nos demuestran la diversidad en la genética de cepas de *S. aureus*. El conocimiento de la variabilidad genética puede ayudar en la aplicación de medidas preventivas y tratamientos más eficaces, pues permite la identificación de los factores de virulencia específicos de la bacteria asociados con la mastitis.

INTRODUCCIÓN

A nivel nacional el estado de Jalisco es el mayor productor de leche de vaca, aporta el 18.8% de la producción total del país (2, 182,728 millones de kilos anuales, SIAP, 2016), la producción proviene principalmente de razas lecheras especializadas como es la raza Holstein. México aporta el 3% de la producción de leche de vaca a nivel mundial, ocupando la octava posición a nivel global (SIAP., 2017). En las regiones de Altos Norte, Altos Sur y Ciénega se localizan los 10 municipios con la mayor producción de leche de vaca del estado de Jalisco, sumada la producción de estos municipios representa dos terceras partes de la producción total del estado (SIAP, 2014).

En la industria lechera el problema más frecuente y costoso a nivel mundial es la mastitis (Halaza et al., 2007), siendo la principal enfermedad endémica que afecta al ganado lechero (Juronen et al., 2018).

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, causada principalmente por patógenos (Bedolla et al., 2007) que ocasiona una disminución en la producción y calidad de la leche en su forma clínica y subclínica con pérdidas económicas que pueden alcanzar hasta cinco mil pesos por cada lactancia de una vaca al año (Van et al., 2016).

Se han encontrado alrededor de 137 microorganismos en ganado lechero con mastitis, siendo el género *Staphylococcus* spp los que más frecuentemente se aíslan (Wolter et al., 2004) ya que expresan factores de virulencia que permiten su persistencia y distribución en el huésped (Marqués et al., 2013).

En la actualidad el género de estafilococos cuenta con 52 especies y 28 subespecies (Parte, 2017). Siendo *S. aureus* la especie de estafilococo más virulenta, donde casi todas las cepas aisladas secretan coagulasa (enzima que provoca la coagulación del plasma), existiendo otras especies

dentro de este género que carecen de coagulasa y por lo regular se hace referencia a ellas como estafilococos coagulasa negativos (Harvey et al., 2008).

S. aureus en la actualidad es considerado como uno de los principales agentes causantes de mastitis a nivel mundial (El-Sayed, 2006b), con una frecuencia de casi el 30% de muestras de vacas con mastitis (Calderón y Rodríguez, 2008).

La mayoría de las cepas segregan un grupo de enzimas y citotoxinas que incluyen hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasas. Algunas pueden producir toxinas adicionales como la toxina-1 (TSST-1) responsable del shock tóxico, enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, y SEI), toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y leucocidinas; las cuales actúan inhibiendo las respuestas inmunitarias del huésped (Dinges et al., 2000).

Algunos de los genes encontrados en cepas aisladas de mastitis están relacionados con la formación de “biofilms” o biopelículas, factores de colonización y producción de toxinas (cuadro 1).

Cuadro 1. *Genes asociados a la virulencia en Staphylococcus aureus.*

Genes (formación de Biofilm)	Función
Ica	Adhesión intercelular
Bap	Proteína asociada a biofilm
Aap	Proteína asociada a acumulación
Operones ypfP, ItaA, ItaS, tag y dlt	Síntesis de ácidos teicoicos y lipoteicoicos
Operón cap	Biosíntesis de polisacárido capsular
Genes (factores de colonización)	Función
Vwb	Proteína secretada de la unión del factor de Von Willebrand precursor (WBP)
Vwb^{Sbo5}	Isla de patogenicidad estafilocócica (SAPI) siendo una variante de WBP llevado por SaPI bov5
clfA y clfB	Factor de aglutinación A y B
fnbA y fnbB	Proteína de unión a fibronectina A y B
StI	Represor transcripcional SAPI (islas de patogenicidad estafilocócica)
Eap	Proteína de adhesión extracelular
sasG	Proteína de la superficie G de <i>S. aureus</i>
plsC	Enzima glicerol 3- fosfato
Sak	Estafiloquinasa
Spa	Región ligando de la unión de la proteína A a la inmunoglobina G
Genes (producción de toxinas)	Función
luk E, luk D, luk M	Precursor de las leucocidinas luk E, luk D y luk M
lukF'-PV	Precursor de leucocidina F -Panton valentine
LukF	Subunidad de la leucocidina F
luk S	Leucocidina/hemolisina toxina subunidad S
Hla y Hlb	Precursor de la hemolisina alfa y hemolisina beta
Hlg (subunidades A, B y C)	Componente de la hemolisina gama
Hld	Hemolisina delta
Atl	Precursor de la auto lisina bifuncional
Tst	Toxina 1 del síndrome de shock toxico
Eta y Etb	Toxina exfoliativa A y toxina exfoliativa B
Sea	Enterotoxina estafilocócica A
Sec bov	Variante bovina de la enterotoxina estafilocócica C
Seg, Sei, Sel, Sen y Seo	Toxina exfoliativa G, I, L, N y O

Fuente: (Peton et al., 2014).

S. aureus está conformado de un ADN lineal de aproximadamente 2, 800,000 pares de bases (pb), con un contenido bajo en Guanina-Citosina (33%) (Cervantes-García et al., 2014). Con un contenido

de 2, 254 genes en el interior de su núcleo, según un estudio realizado por Kant et al. (2015) en la secuenciación de 4 cepas de *S. aureus* aisladas en Brasil.

Una característica importante del genoma de *S. aureus* es su gran cantidad de elementos móviles (plásmidos, secuencias de inserción y transposones) y la presencia de islas de patogenicidad (SaPIs) de diferente tamaño, los cuales presentan características adicionales como el contenido de genes de virulencia y resistencia (Kuroda et al., 2001, Cervantes-García et al., 2014).

Existe una variedad de métodos de genotipificación, entre los más destacados se encuentran la electroforesis de campos pulsados (PFGE), la tipificación del gen Spa, la tipificación de secuencias de locus múltiple (MLST), el análisis de perfil de plásmido, el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) y el análisis de toda la secuencia del genoma ADN (Struelens et al, 2009).

La electroforesis de campos pulsados (PFGE) es una poderosa técnica de genotipificación utilizada para separar grandes moléculas de ADN (ADN genómico completo) después de una macrorestricción (digestión con una enzima de restricción que corta en varios puntos del genoma) y aplicarlas a una matriz de gel de agarosa bajo el campo eléctrico que periódicamente cambia de dirección. La PFGE es una variación de la electroforesis en gel de agarosa que permite el análisis de fragmentos de ADN bacteriano de mucha mayor magnitud que el análisis de enzimas de restricción convencional.

OBJETIVO

Determinar la variación genética de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras del estado de Jalisco, así como el grado de similitud genética a nivel general y a nivel regional.

PARTE EXPERIMENTAL

El muestreo se realizó en 27 establos pertenecientes a 10 municipios del estado de Jalisco (Acatic, Arandas, Atotonilco el Alto, Encarnación de Díaz, la Barca, Lagos de Moreno Tepatlán de Morelos, y San Juan de los Lagos, San Miguel el Alto y Tototlán), obteniendo un total de 1,325 muestras de leche de 335 vacas.

Se realizó identificación de género y especie por medio de cultivos bacteriológicos, pruebas bioquímicas y comprobación molecular por PCR en el Laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

La variación genética de *S. aureus* se determinó mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE) a las cepas positivas al PCR (32 muestras seleccionadas), realizando previamente la inoculación de las cepas en agar sangre, preparación de bloques de agarosa a partir de cultivos, lisis y lavado de las células bacterianas en los bloques de agarosa, restricción del ADN mediante la enzima Sma1, electroforesis, tinción y documentación de los resultados.

El análisis y determinación de parentesco se realizó a través de dendrogramas con la ayuda del software Bionumerics® (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), usando el coeficiente de correlación de Dice y el algoritmo de agrupación de promedio matemático del grupo de pares no ponderado (UPGMA). Elaborándose un dendrograma de similitud del total de las muestras y uno por cada región muestreada.

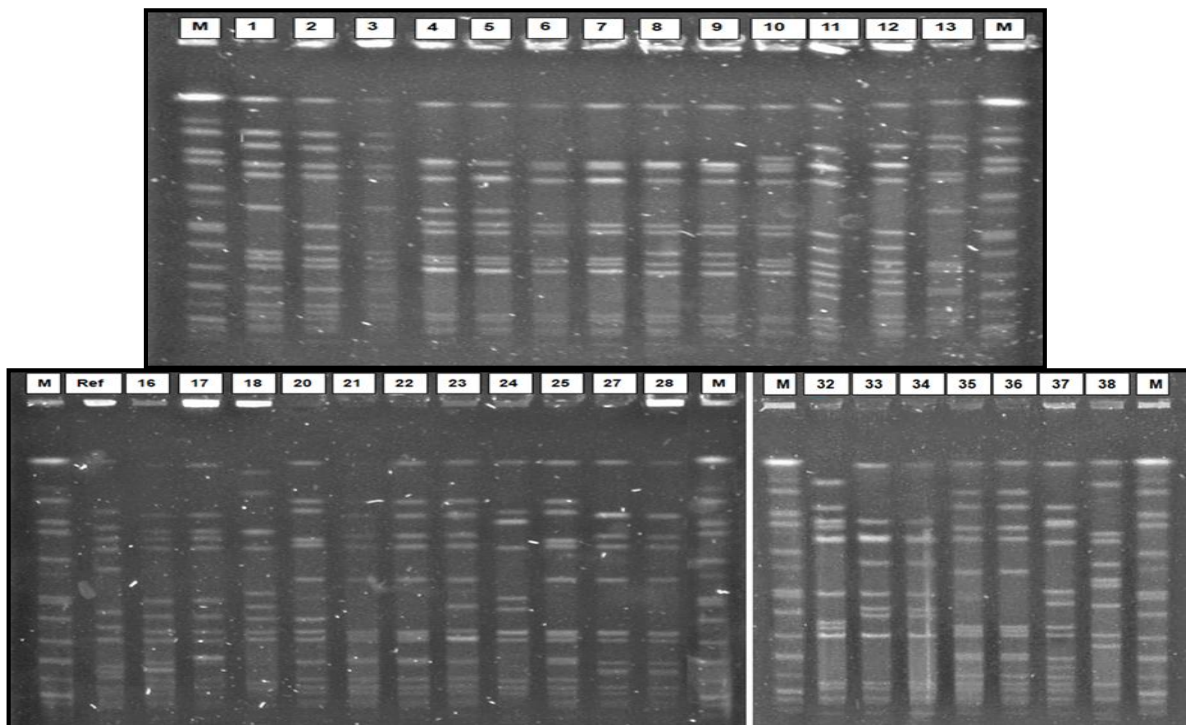
RESULTADOS

Se obtuvo un porcentaje de similitud genética del 85.1%, lo que corresponde al 14.9% de variación genética de las 32 cepas aisladas de los 10 municipios muestreados del Estado de Jalisco.

Las 32 cepas se agruparon en 12 perfiles genéticos con un 95% o más de similitud genética dentro de cada perfil. (Figura 1). El pulsotipo (p3), fue el mayormente encontrado agrupando al 25% del total de cepas analizadas (8/32).

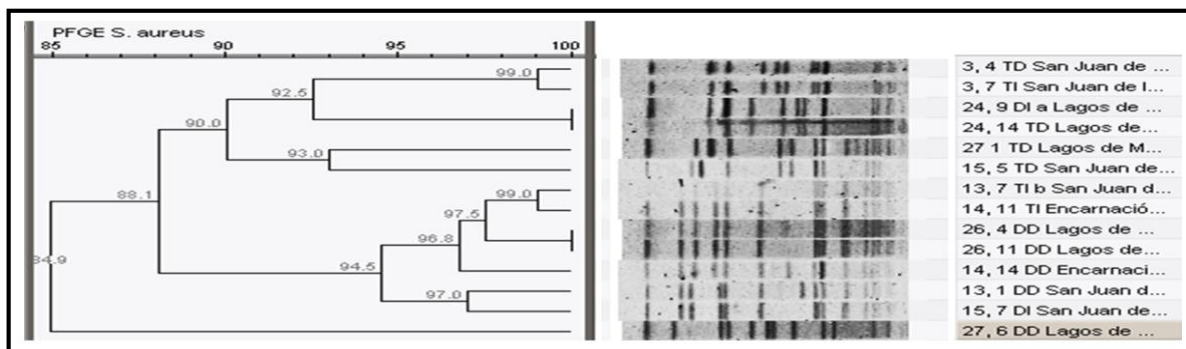
De 32 cepas de *S. aureus* representativas aisladas se obtuvieron los siguientes perfiles genéticos mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE) (Figura 2).

Figura 2. Perfiles genéticos de 32 cepas de *S. aureus* aisladas mediante la técnica de PFGE.



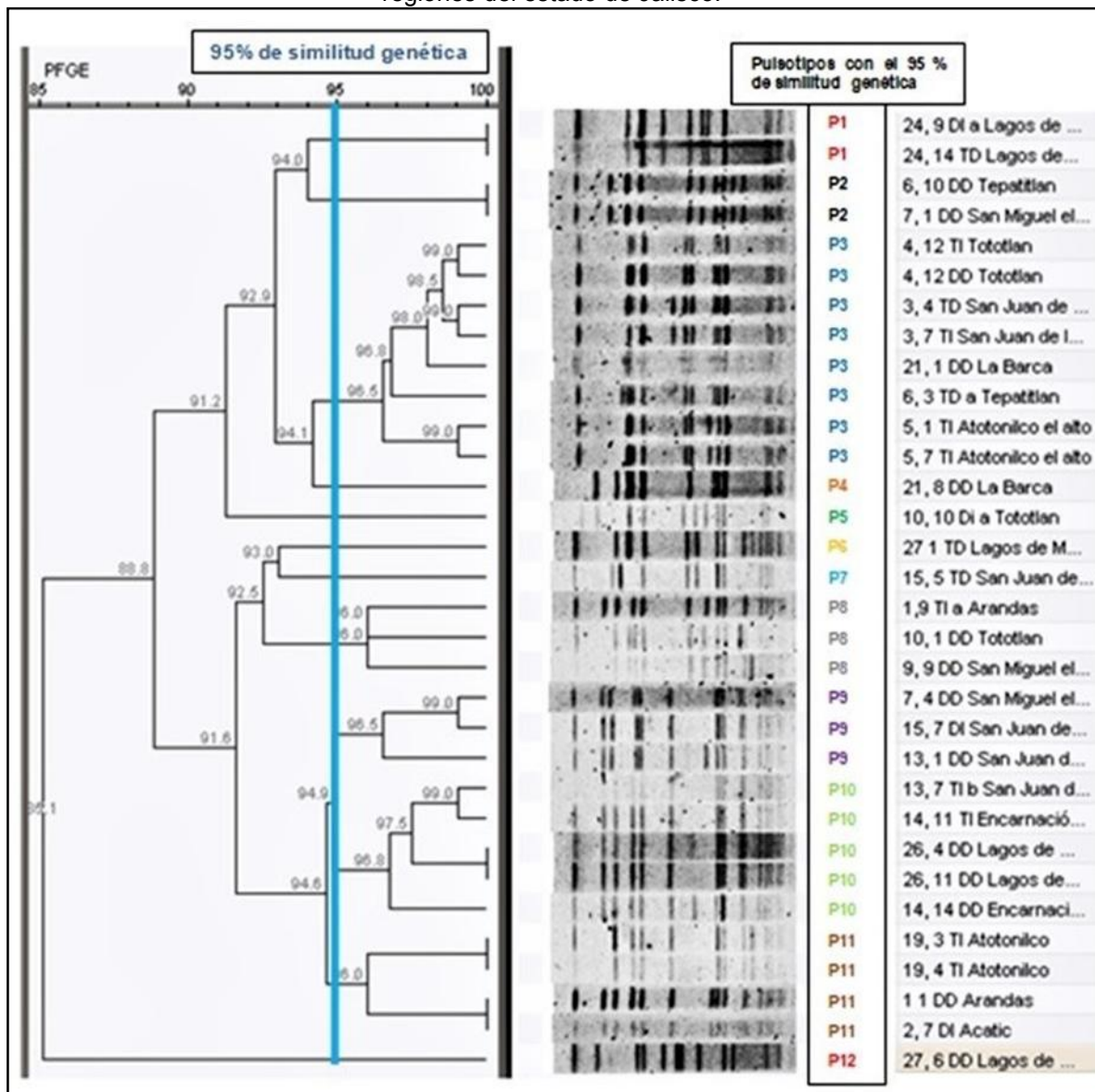
De las 14 cepas aisladas de los 3 municipios ubicados en la región Altos Norte (Encarnación de Díaz, Lagos de Moreno y San Juan de los Lagos) se obtuvo un porcentaje del 84.9% de similitud genética, lo que corresponde a el 15.1% de variación genética (Figura 3).

Figura 3. Dendrograma de perfiles genéticos de 14 cepas de *S. aureus* aisladas en la región Altos Norte del estado de Jalisco.



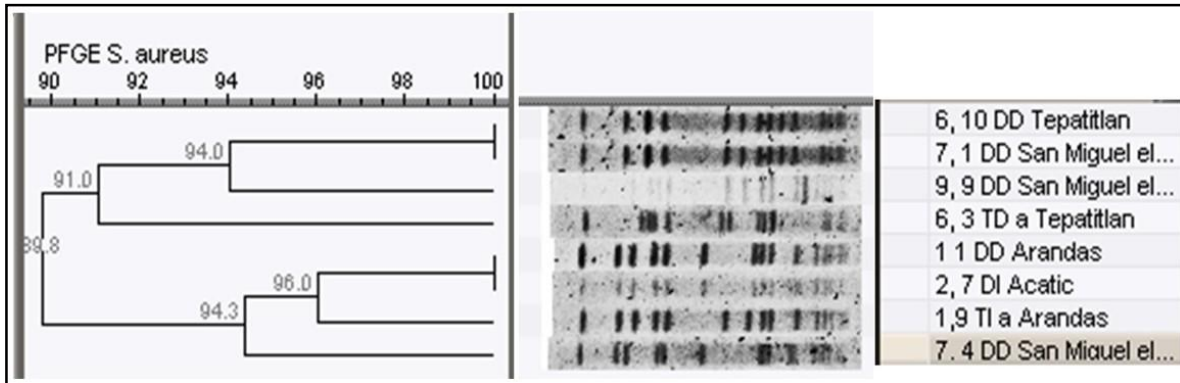
Se obtuvo un porcentaje del 90.2% de similitud genética, de las 10 cepas aisladas de los municipios (Atotonilco el Alto, la Barca y Tototlán) ubicados en la región Ciénega, lo que corresponde al 9.8% de variación.

Figura 1. Dendrograma de perfiles genéticos de 32 cepas de *S. aureus* aisladas en diferentes regiones del estado de Jalisco.



En el caso de las 8 cepas aisladas de los municipios muestreados (Acatic, Arandas, San Miguel el alto y Tepatlán de Morelos) en la región Altos Sur se obtuvo un porcentaje del 89.8% de similitud lo que corresponde al 10.2% de variación genética (Figura 4).

Figura 4. Dendrograma de perfiles genéticos de 8 cepas de *S. aureus* aisladas en la región Altos Sur del estado de Jalisco.



CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

A partir de los hallazgos encontrados, se acepta la hipótesis general que establece que se encuentran variaciones genéticas mayores a un 10% de *S. aureus* aisladas de vacas lecheras del estado de Jalisco, encontrándose el 14.9% de variación genética entre las 32 cepas analizadas en este estudio.

Los resultados relacionados con la variación genética observados en el presente trabajo son similares a los citados por Cany et al. (2017), quienes encontraron una relación genética del 90% de cepas aisladas de leche cruda de vaca en Turquía, lo que corresponde al 10% de variación genética, quizás debido a que los *S. aureus* aislados presentan un genotipo relativamente similar, ya que requieren de las mismas características que les permita estar adaptados tanto dentro como fuera de la glándula mamaria.

Castañeda et al. (2011) mostró una estrecha relación de cepas de campo de *S. aureus* responsables de mastitis en el occidente de México, sugiriendo que clones estrechamente relacionados de *S. aureus* son los responsables de la mayoría de las infecciones intramamarias provocadas en el estado de Jalisco.

Marqués et al. (2013) observó en Brasil una marcada diversidad de clones de *S. aureus* detectando seis perfiles genéticos distintos mediante la electroforesis de campos pulsados (PFGE).

Sato et al. (2017) encontraron variaciones genéticas de hasta 30% de 41 cepas de *S. aureus*, aisladas en Japón de vacas con mastitis, humanos y en carne destinada a la venta. Las cepas obtenidas de leche de vaca cruda presentaron una similitud del 90%.

Los resultados obtenidos de las cepas aisladas de los establos muestreados, nos demuestra la gran diversidad en la variación genética de cepas de *S. aureus*, ya que se encontraron 12 perfiles genéticos diferentes de 32 cepas analizadas, posiblemente debido a la diversidad de establos pertenecientes a diferentes municipios, ya que en cepas aisladas del mismo establo se presentó una gran similitud, en algunas de ellas llegando al 100 %.

Se encontró que un solo pulsotipo (p3) apareció con mayor frecuencia, agrupando al 25% del total de cepas analizadas (8/32), por lo que representó el más representativo dentro de la zona muestreada.

Los resultados obtenidos con las cepas aisladas nos demuestran la diversidad en la genética de cepas de *S. aureus*. El conocimiento de la variabilidad genética puede ayudar en la aplicación de medidas preventivas y tratamientos más eficaces, pues permite la identificación de los factores de virulencia específicos de la bacteria asociados con la mastitis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bedolla, C. C., Castañeda, V. H. y Wolter, W. 2007. Métodos de detección de mastitis bovina. Rev Electrón Vet. 8: 1-17.

2. Calderón, A. y Rodríguez, V. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Rev colomb de cienc pecu.* 21: 582-589.
3. Can, H. Y., Elmalı, M. and Karagöz, A. 2017. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean J Food Sci An.* 37: 175.
4. Castañeda, V. H., Jäger, S., Wolter, W., Zschöck, M., Castañeda, V. M. A. and El-Sayed, A. 2011. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in México. *Rev Científic.* 21: 308-316.
5. Castañeda, V. H., Jäger, S., Wolter, W., Zschöck, M., Castañeda, V. M. A. C. and El-Sayed, A. 2013. Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 65: 377-382.
6. Cervantes-García, E., García-González, R. y Salazar-Schettino, P. M. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab.* 61: 28-40.
7. Dinges, M. M., Orwing, P. M. and Schlievert, P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clín Microbiol Rev.* 13: 16-34.
8. El-Sayed, A., Alber, J., Lämmmler, C., Abdulmawjood, A., Zschöck, M. and Castaneda, V. H. 2006a. Comparative sequence analysis of spa gene of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: characterization of an unusual spa gene variant. *J dairy Res.* 73: 322-327.
9. El-Sayed, A., Alber, J., Lämmmler, C., Jäger, S., Wolter, W. and Castañeda-Vazquez, H. 2006b. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. *Vet Mex.* 37: 165-179.
10. Halaza, T., Huijps, K., Osteras, O. and Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management. *Vet Quart.* 29: 18-31.
11. Harvey, R. A., Champe, P. C. and Fisher, B. D. 2008. *Microbiología*. Ed. Lippincott Williams y Wilkins. p 36, 38 y 300
12. Kant, R., Taponen, S., Koort, J., Paulin, L., Ävall-Jääskeläinen, S. and Palva, A. 2015. Genome sequences of four *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Genome announcements.* 3: e00334-15.
13. SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). 2017. Panorama de la leche en México. Disponible en la Web: http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/B_leche_%20junio2017.pdf.
14. Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B. and Zschock, M. 2004. *Mastitis Bovina*. Ed., Editorial Universitaria. p 18, 45, 47 y 48.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y VALOR NUTRITIVO DE LA SEMILLA DE AGUACATE Y SU POSIBLE USO COMO ADITIVO ALIMENTARIO

Fernando Adalith Castillo Sánchez, María Gloria Cornelio Moreno, Rosa María García Martínez

Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Morelia, Mich.

RESUMEN

El aguacate es uno de los productos más exitosos de la exportación agroalimentaria nacional. México es el principal proveedor del mercado internacional con un aporte del 45.95% del valor de las exportaciones mundiales. El aguacate se ha destacado por sus diferentes usos: medicinales utilizando hojas, cáscaras, semillas y corteza, extracción de aceites. La principal forma de utilización del aguacate es el consumo de la fruta en fresco o pulpa procesada. El aceite de aguacate es tan competitivo como el aceite de oliva, por ser rico en grasas no saturadas y vitamina E, por su baja acidez. Si bien, el aguacate tiene una gran lista de propiedades y beneficios, es su semilla donde se encuentran concentrados la mayoría de sus propiedades. El objetivo de este proyecto es recabar información sobre la semilla de aguacate dado su importancia como subproducto y derivado agroindustrial y obtener datos sobre su composición química proximal, capacidad antioxidante y valor nutritivo y explotar sus propiedades nutricionales y antioxidantes para ofertarlo como aditivo en la industria alimentaria. Se procedió a la selección del hueso, pelado y rayado. Se extruyó la fruta y se desecó a 105°C en estufa obteniéndose una humedad final de 51.5%, se determinó cenizas a una temperatura de 500 a 600°C obteniendo un 2.35% y se determinó fibra con un valor final de 3.2%. Se extrajo el aceite del hueso o semilla y se corrió un perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases. Se ha demostrado que el hueso de aguacate contiene una cantidad significativa de fibra y un patrón de AG saludables como la misma pulpa, lo que lo hace atractivo para su uso como aditivo alimentario. Además que se explotaría este subproducto dándole un valor agregado y radicando su importancia en lo que puede ofrecerle como beneficio al ser humano.

INTRODUCCIÓN

El aguacate es uno de los productos más exitosos de la exportación agroalimentaria nacional. México es el principal proveedor del mercado internacional con una aportación de 45.95% del valor de las exportaciones mundiales. En estados unidos es promovido y consumido en eventos con alcance internacional, como el super bowl, en la cual se han llegado a consumir 100,000 toneladas durante el día del evento.

En el 2016 las exportaciones mexicanas representaron un porcentaje muy significativo de las importaciones de aguacate en los siguientes países: Guatemala 100%; Canadá 95.41%; Japón 92.72%; Estados Unidos 91.32%, y El Salvador 90.23%

Los empacadores michoacanos clasifican el tamaño de los aguacates según su calibre, de acuerdo a las especificaciones de la Norma Mexicana NMX-FF-008.

Calibre	Peso de la fruta (gramos)
Súper extra	Mayor a 266
Extra	211 a 266
Primera	171 a 210
Mediano	136 a 170
Comercial	85 a 135
Canica	Menor a 85

De 42 municipios que producen aguacate en Michoacán, sólo 6 representan 79% de la producción total en el estado; éstos son Uruapan (19%), Tancítaro (19%), Peribán (13%), Tacámbaro (10%), Ario (9%) y Salvador Escalante (9%). (Grupo PM con información de SIAP, 2009).

El aguacate Hass: (el más popular en el mercado internacional): Cuando está maduro, su cascara adquiere un tono oscuro, casi negro. Su piel pasa de verde oscuro a verde purpurino. Tiene un gran

sabor a nuez y avellana, con textura suave-cremosa y una semilla de pequeña a mediana. Disponible durante todo el año. El aguacate Hass proviene de injerto, mezcla de diferentes variedades de aguacate, desarrollado por Rudolph Hass.

Reed (2001) nos comenta que la tendencia de utilizar en forma creciente el aceite de aguacate para uso culinario, es por tener entre otras cualidades: un alto punto de humo, excelente sabor y un color verde muy atractivo, siendo preferido por los chef de cocina de la alta gastronomía europea, sustituyendo al aceite de oliva, el comparó el aceite de oliva con el aceite de aguacate, determinando que este último presenta mayores niveles de: clorofila, Índice de Yodo, Vitamina E y un menor nivel de acidez libre, lo que constituye una mejor calidad.

El aguacate, dependiendo de la variedad y madurez, alcanza en la pulpa niveles de hasta 25% de aceite, con valores promedios de 15-19%, lo que permite lograr rendimientos de alrededor de 10% de la fruta fresca Schwartz.

El rico contenido vitamínico del aceite de aguacate beneficia a la industria de la cosmética ya que la vitamina A ayuda a prevenir la sequedad de la piel y la vitamina E (tocoferol) junto a la D, son efectivas contra el envejecimiento de la 14 piel, debido a la abundancia de ácidos grasos insaturados.

TEORÍA

Una de las tendencias actuales de investigación se ha enfocado en el conocimiento de nuevas fuentes de productos naturales que tienen propiedades nutraceuticas y funcionales y juegan un papel muy importante, actuando como agentes protectores de la salud. Muchas de esas fuentes son frutas y hortalizas y su consumo se asocia con la disminución del riesgo de ciertas enfermedades crónicas, tales como enfermedades coronarias y algunos tipos de cáncer, la artritis, la disminución de la disfunción cerebral y las cataratas. De ahí que las políticas alimentarias en países desarrollados fomentan el uso de dietas que incluyan la ingesta diaria de al menos cinco porciones de frutas y hortalizas. Esto se atribuye a que estos alimentos proporcionan una mezcla óptima de antioxidantes naturales, fibras y otros compuestos bioactivos.

Por otra parte, derivado de la industrialización de alimentos se tienen diversos residuos o subproductos que son importantes y presentan un valor económico agregado aunado a múltiples beneficios al ser humano y que hasta la fecha no han sido explotados al 100% para ser reutilizados, aprovechando esa fuente nutrimental y disminuyendo la contaminación del medio ambiente.

El aguacate es un fruto que pertenece a la familia Laurácea y su nombre proviene del náhuatl *Ahuacatl*, palabra que significa “testículos del árbol”, su nombre científico es *Persea Americana*. El origen del aguacate tuvo lugar en las partes altas del centro y este de México, y partes altas de Guatemala. Esta misma región está incluida en lo que se conoce como Mesoamérica, y también es considerada como el área donde se llevó a cabo la domesticación del mismo. Existe evidencia directa de la domesticación en el período clásico maya del maíz, calabaza, yuca, algodón, aguacate, camote, y el agave, lo cual está sustentado por restos de planta en el contexto arqueológico y lingüístico que le dan validez a esta lista de cultivos.

Después de la conquista los españoles llevaron el aguacate a España en 1600 y posteriormente comenzó la distribución del aguacate a nivel mundial. México es uno de los países con amplia diversidad de tipos de aguacate y existen en el país al menos 20 diferentes especies relacionadas con el aguacate. Esta gran variabilidad puede ser debida a diferentes condiciones ambientales presentes a lo largo y ancho del territorio nacional y a la naturaleza que le ha conferido al aguacate, mecanismos que hacen maximizar el cruzamiento con otros tipos, y por lo tanto incrementa la variabilidad genética y por ende, ampliar la adaptación a un mayor número de ambientes.

El aguacate es uno de los productos más exitosos de la exportación agroalimentaria nacional. México es el principal proveedor del mercado internacional con una aportación de 45.95% del valor de las exportaciones mundiales. En el 2016, las exportaciones mexicanas representaron un porcentaje muy significativo de las importaciones de aguacate en los siguientes países: Guatemala 100%; Canadá 95.41%; Japón 92.72%; USA 91.32%, y El Salvador 90.23%. A nivel nacional, de 42 municipios que producen aguacate en Michoacán, sólo 6 representan 79% de la producción total en el estado; éstos son Uruapan 19%, Tancitaro 19%, Peribán 13%, Tacámbaro 10%, Ario 9% y Salvador Escalante 9%.

El aguacate es una fruta exótica que agrada el paladar, su cultivo y producción se ha extendido a Europa, África, Oceanía y América del Sur y su demanda por todo el mundo presenta distintos usos

y aplicaciones. Las formas de consumo varían sustancialmente de regiones a regiones en todo el orbe. Nutricionalmente, el aguacate es una fuente potencial de energía debido a la composición rica en ácidos grasos además de que es una excelente fuente de vitamina E. La composición química varía de acuerdo a la variedad, origen de la fruta y su estado de maduración, entre otras. Es de conocimiento, que su consumo está asociado a muchos beneficios a la salud dado su gran efecto de eliminar el colesterol de baja densidad y el de proporcionar fibra dietética. Uno de los principales atractivos de esta deliciosa fruta, es su alto contenido en grasa que supera a la de cualquier otra fruta. Cabe destacar que no sólo es su contenido en cantidad sino también la calidad de las grasas saludables, ya que presenta un patrón de ácidos grasos tan atractivo como los comparados con el aceite de oliva. También se han encontrado compuestos nutracéuticos que lo hacen ser un fruto muy rico nutricionalmente.

La industrialización del aguacate, se ha desarrollado en base a los usos actuales tal como fruta procesada en forma de guacamole en base húmeda y guacamole deshidratado, en helados, cremas, dips, extracción del aceite y obviamente, su comercialización nacional y de exportación de la fruta en fresco para fines de consumo directo. Además de estos productos con su humedad natural, la pulpa del aguacate se está usando para deshidratarla y producir harina, para ello se incluye los métodos de liofilización, aspersión, deshidratación osmótica, deshidratación por microondas y en forma combinada. Cabe indicar que de las aplicaciones indicadas, la de mayor uso potencial es como fuente de aceite comestible o aceite para cosméticos.

Estas formas de industrializar el aguacate así como su utilización para su consumo directo producen una materia prima principal, pulpa para la extracción del aceite de aguacate más dos subproductos: la cáscara y la semilla o hueso del aguacate. La pulpa del aguacate es rica en AG monoinsaturados además de vitaminas y componentes nutracéuticos. Este tipo de baya contiene un mesocarpio y endocarpio carnosos que contienen una sola semilla la cual representa el 16% del peso de la fruta. En lo que respecta a la composición química de la semilla se ha encontrado que presenta una gran similitud en el contenido de AG comparado al del aceite de la pulpa, así como en los taninos y en cuanto a su actividad antioxidante, se ha reportado que la semilla presenta un 70% de la actividad antioxidativa.

Actualmente se cuenta con ciertas investigaciones, sin embargo la información sobre cáscara y semilla sigue siendo pobre o limitada y como subproductos, ha sido poca la atención con vías a su reutilización. La agroindustrialización de una materia está determinada por el producto primario que se desea obtener de esa materia prima, pero además del componente mayoritario, se tienen otros subproductos que también son importantes en ésta explotación dándole un valor agregado y radicando su importancia en lo que puede ofrecerle como beneficio al ser humano y que estos subproductos que ofrecen compuestos químicos de diversa funcionabilidad deben ser explotados y aprovechados. Es de gran interés dado el enfoque a la química verde y de sustentabilidad el que se tenga información sobre uno de los subproductos potenciales derivados del uso tecnológico de la pulpa del aguacate, es decir, de la semilla. Por lo tanto, en esta investigación se propone cuantificar su disponibilidad, conocer el contenido de macro y micronutrientes, de sus componentes químicos orgánicos e inorgánicos, el contenido de polifenoles, de taninos, su valor nutrimental, contenido y perfil de ácidos grasos y de su capacidad antioxidante. Toda esta información de tipo fisicoquímico, nutrimental y nutracéutico será útil, de sustento y de gran importancia para poder proponer a la ralladura de la semilla de aguacate como aditivo alimentario en la elaboración de alimentos funcionales o bien simplemente en la integración de suplementos para alimento de ganado.

PARTE EXPERIMENTAL

Limpieza. Retirar todo lo que podría tener aun de pulpa así como retirar la cascara que cubre al hueso.

Rayado. Se procede a rayar la semilla

Secado. Colocar el hueso previamente rallado en un plato para llevarlo a estufa a 105 °C durante 1hr para retirar todo su contenido de agua.

A la harina obtenida de este proceso se le realiza inicialmente el análisis bromatológico completo, el cual incluye los siguientes parámetros:

10. Determinación de humedad
11. Determinación de cenizas

12. Determinación de grasa total
13. Determinación de fibra cruda
14. Determinación de proteína o nitrógeno proteico (método kjeldhal)

Así también a la grasa obtenida mediante extracción soxhlet se le realizó un perfil de ácidos grasos y se cuantificó antioxidantes.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos del análisis proximal a la semilla del aguacate se expresan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Análisis Proximal de la Semilla del Aguacate variedad Hass

PARÁMETRO	VALOR
umedad	51.50 %
Cenizas	2.35 %
Grasa total	3.52 %
Proteína	2.46 %
Fibra insoluble	3.20 %
Carbohidratos digeribles totales	36.97 %

Tabla 2. Capacidad Antioxidante en DPPH

Metanol-agua μmol ET/g	Agua μmol ET/g	Acetona μmol ET/g
79.34	73.15	77.25

Tabla 3 . Principales AG encontrados en la semilla de Aguacate variedad Hass

NOMBRE	Área %
MIRISTICO	5.90724
PALMITICO	5.95278
MARGARICO	7.83498
ESTEARICO	7.73910
OLEICO CIS	9.08251
LINOLEICO CIS	15.94910
APAQUIDICO	12.84694
BEHENICO	23.95312

CONCLUSIÓN

Se concluye que el hueso de aguacate contiene una gran cantidad de propiedades químicas que se pueden utilizar, destacándose la fibra, que en la actualidad se considera muy importante su consumo diario tanto por sus propiedades fisiológicas como funcionales. No podemos concluir de alguna manera su ingesta en la dieta humana ya que aún no tenemos el panorama completo de resultados para poder proponerla como aditivo alimentario en el proceso de alimentos funcionales o alimento para ganado, atribuyéndose por la presencia de antioxidantes naturales, fibra y compuestos bioactivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arpaia, Mary Lu, 2004. Optimum Procedures for Ripening Avocados. Management of Fruit Ripening. Postharvest Technology U.C Davis.
2. Barrientos-Priego, A.F., M.W. Borys, E. Escamilla-Prado, A. Ben-Ya'acov, E. de la Cruz-Torres, and L. López-López. 1992. Study of avocado germplasm resources, 1988-1990. IV. findings in the Mexican Gulf region. Proc. of Second World Avocado Congress II: 551-558.
3. Funes Alejandro. 2005. El aguacate de Michoacán. @gricultura.com.mx. http://www.agricultura.com.mx/cgi-bin/modules.php?name=Content&pa=list_pages_categories&cid=7 .
4. Franco V.S. 2005. Historia del Aguacate. Real Avocados S. A. De C.V. http://mx.geocities.com/quality_hass/historia.html

PREVALENCIA DE ENTEROPATÓGENOS EN ARDILLONES (*OTOSPERMOPHILUS VARIEGATUS*) EN AMBIENTES URBANOS

Andrea Margarita Olvera Ramírez¹ Carlos Alberto López González¹, Gabriela Arteaga Salazar², Luz María Salas Rosas³ y Carlos Alberto Molina Vera³

¹Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, ²Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, ³Licenciatura en Microbiología, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ.

RESUMEN

El crecimiento de la ciudad de Santiago de Querétaro ha generado una reducción de los espacios donde habita fauna silvestre nativa propiciando un incremento en el contacto frecuente con los seres humanos. El presente trabajo tuvo como finalidad determinar la ocurrencia de enteropatógenos de importancia en salud pública en ardillones en un parque urbano. El estudio se llevó a cabo en el parque Alameda Hidalgo Querétaro durante los meses de febrero y abril 2017. El muestreo se hizo durante 8 sesiones de trapeo, en las que el tiempo de captura por día fue de 6 horas. La captura se hizo mediante el uso de trampas Sherman y Tomahawk. La contención química se llevó a cabo con tiletamina/zolazepam (Zoletil). A la captura se obtuvo el sexo del animal, así como el peso y medidas corporales para determinar la edad, y se les tomaron muestras mediante hisopados orales y rectales. Los ejemplares fueron colocados en jaulas de recuperación y liberados en el sitio de muestreo al terminar el manejo. La detección de enteropatógenos se llevó a cabo mediante la detección de genes específicos de cada bacteria por PCR. Cien animales fueron capturados en 8 días, los cuales estuvieron representados en 42 hembras y 58 machos. La prevalencia de enteropatógenos a partir de los hisopados rectales fue de 92, 10 y 47% de *Salmonella* spp. *E. coli* O157 y *L. monocytogenes*. *Salmonella* spp., *E. coli* O157 y *L. monocytogenes* fue detectada en saliva y heces de ardillones, encontrándose una alta prevalencia de *Salmonella* spp.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas compartidas entre animales silvestres y domésticos tienen relevancia para la conservación, principalmente cuando afectan a especies animales amenazadas, y en salud pública cuando se trata de zoonosis, ya que la fauna urbana puede tener contacto con animales domésticos y humanos, sirviendo como reservorios de agentes zoonóticos. Los ambientes urbanos como la ciudad de Santiago de Querétaro se encuentran en constante crecimiento demográfico limitando los escasos fragmentos de paisaje silvestre reduciendo la distribución de la fauna silvestre nativa. Las áreas verdes y parques pueden conservar a la fauna silvestre tolerante al desarrollo urbano. De este modo, la cantidad de recursos alimenticios ya sea por una suplementación directa de alimento o por la cantidad de alimento desechada como basura puede favorecer el incremento del tamaño poblacional de estas poblaciones, incrementando indirecta o directamente el contacto con los seres humanos. Por lo que es de importancia conocer la excreción de microorganismos zoonóticos en la fauna silvestre para tener medidas de control de salud pública.

TEORÍA

La concentración de la población en asentamientos urbanos es un proceso irreversible que tiene un impacto crítico sin precedentes en el ambiente global [1]; por lo que, la pérdida de percepción natural y de espacios naturalizados en el interior de las ciudades ha ocasionado la creación de grandes corredores ecológicos y parques [2]. Los parques urbanos permiten el mantenimiento de una porción de la diversidad biológica original de la región [3, 4]. Algunas especies de pequeños mamíferos silvestres tienen una alta tolerancia a la pérdida y fragmentación del hábitat, por lo que pueden mantenerse en ambientes antropizados [5]; tal es el caso de la familia de las ardillas, las cuales se han adaptado a los paisajes dominados por los seres humanos [6]. Aunado a esto las enfermedades infecciosas compartidas entre animales silvestres y domésticos tienen relevancia para la conservación, principalmente cuando afectan a especies animales amenazadas, y en salud pública cuando se trata de zoonosis, ya que la fauna urbana puede tener contacto con animales domésticos y humanos, sirviendo como reservorios de agentes zoonóticos [7]. Entre estos agentes zoonóticos se pueden encontrar los responsables de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), es

decir, aquellas enfermedades que son causadas por la ingestión de alimentos o bebidas contaminados por microorganismos o sustancias químicas [8]. Las ETAs son un problema recurrente en países tanto desarrollados como en vías de desarrollo y hasta la fecha continúan siendo de importancia en salud pública [9]. Se estima que más de 200 enfermedades son transmitidas por medio de alimentos y los microorganismos causantes pueden ser hongos, virus, parásitos y bacterias, siendo entre estos más importantes las bacterias; de las cuales destacan *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. y *Listeria monocytogenes* [10-12].

La ciudad de Santiago de Querétaro se encuentra en constante crecimiento y la mancha urbana sigue ampliándose; en ocasiones desplazando a la fauna silvestre nativa, en otras aislándola de otras poblaciones. No obstante, mantiene áreas verdes y parques para el bienestar de la sociedad, los cuales funcionan cuando se les permite funcionar como hábitat de carácter marginal para la fauna silvestre; tal es el caso de la Alameda, Hidalgo. La cual es un parque ornamental que se encuentra en el centro de la ciudad de Querétaro y que mantiene una muestra de la fauna silvestre tolerante a las zonas urbanas, sin embargo, al estar aislada de otras áreas verdes, se ha propuesto que algunas de sus poblaciones, como es el caso de la población de ardillones (*Otospermophilus variegatus*) han crecido desmesuradamente debido a un exceso de recursos alimenticios proporcionados por los seres humanos [13]. Este crecimiento, puede incrementar el contacto con el humano y determinar la presencia de microorganismos patógenos que puedan causar enfermedad al humano. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la ocurrencia de enteropatógenos de importancia en salud pública en ardillones en un parque urbano de la Ciudad de Santiago de Querétaro.

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se llevó a cabo en el parque Alameda Hidalgo, el cual está localizado entre la Avenida Ignacio Zaragoza y Avenida Constituyentes, en el Centro Histórico de la ciudad de Querétaro. El muestreo de los animales se hizo cuando el parque se encontraba cerrado al público (miércoles), a lo largo de ocho sesiones de trampeo separadas por ocho días entre cada una. El tiempo dedicado a la captura de ardillones por día de muestreo fue aproximadamente de seis horas, las capturas se hicieron mediante el uso de 60 trampas tipo Sherman® y seis Tomahawk®, El parque se dividió en cuatro cuadrantes distribuyendo 15 trampas Sherman® en cada uno y las Tomahawk® se colocaron cerca de las madrigueras. El atrayente usado en las trampas fue una mezcla de avena, cacahuates, semilla de girasol y crema de cacahuete. Posterior a la captura física de un ardillón, se llevó a cabo la contención química utilizando una mezcla de tiletamina/zolazepam (Zoletil®, 100mg/ml) con una dosis de 6 mg/kg. Una vez que los organismos se encontraban bajo el efecto de los químicos, se obtuvieron medidas morfométricas, peso, sexo, así como una muestra de sangre de la vena safena, e hisopos de mucosa bucal y anal. Una vez terminado el manejo el ejemplar, estos fueron colocados en jaulas de recuperación, posteriormente los animales fueron liberados en el sitio de captura. Tanto los hisopos salivales como anales y la sangre fueron llevados al laboratorio de Microbiología Veterinaria de la FCN-UAQ, los hisopos fueron refrigerados a 4°C para su posterior análisis y la sangre fue congelada a -20°C. Los hisopos salivales y rectales fueron sometidos a pre-enriquecimiento con el método descrito por Urdahl *et al.* [14] con modificaciones, en agua peptonada amortiguada, incubados por 24 h a 35 °C. Posteriormente se realizaron 2 alícuotas de 1 ml para extracción de ADN y 2 de 1.2 ml a las que se les agregaron 0.3 ml de glicerol (20 %) como crioprotector a cada una.

La extracción de ADN de los hisopados pre-enriquecidos se hizo de acuerdo a los protocolos descritos por Kongmuang *et al.* [15] y Soumet *et al.* [16]. La detección enteropatógenos fue mediante PCR en punto final utilizando los oligonucleótidos reportados por Garrido *et al.* [17]. Para el género *Salmonella* se hizo detectando el gen *invA*, para *E. coli* O157 se utilizó el gen *rfbE* y para *L. monocytogenes* el gen *prfA*. Las reacciones de PCR fueron múltiples para la detección de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157, mientras que para *L. monocytogenes* se hicieron de manera independiente. Las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 12 µl, por lo que se agregaron 6 µl de mezcla de reacción (Maxima Hot Start PCR Master Mix (2x), Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.4 µl de cada uno de los oligonucleótidos (10 µM), 1.6 µl de Albúmina de Suero Bovina (BSA) (Thermo Fisher Scientific Inc.) diluida a 2 mg/ml, 1 µl de ADN de cada muestra. Para ambas reacciones se completó el volumen a 12 µl con agua libre de nucleasas. Todas las reacciones

se hicieron por duplicado. Como controles positivos se utilizaron muestras de ADN de *Salmonella enterica* Typhimurium, *E. coli* O157 y *Listeria monocytogenes*, los cuales se estandarizaron previamente. El programa de termociclado para la detección de enteropatógenos fue el siguiente: 95°C por 4 minutos como paso de desnaturalización inicial, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 57°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Al paso de elongación se le añadió 5 minutos a 72°C después de los ciclos y finalmente se dejó la muestra a 12°C. Los PCR se llevaron a cabo en termociclador C1000 de (Bio-Rad Laboratories), Los duplicados de cada muestra se juntaron en un solo tubo y se almacenaron a -20°C hasta su visualización en geles de agarosa. Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa. Para la verificación de los productos de PCR se utilizó la agarosa al 1.5% y Gel Red para la detección de DNA. Los geles de agarosa se corrieron en búfer TAE 1x frío a 90 V durante 45 minutos y se visualizaron mediante exposición a luz UV en el fotodocumentador Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories) utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

RESULTADOS

Capturamos un total de 100 animales en 8 días, los cuales estuvieron representados por 42 hembras y 58 machos. La prevalencia de *Salmonella* spp., *E. coli* O157 y *Listeria monocytogenes* a partir de los hisopados rectales fue de 92, 10 y 47 % respectivamente. En cambio, a partir de los hisopados salivales se obtuvo una prevalencia general de 97 % para *Salmonella* spp., de 1 % para *E. coli* O157 y de 46 % para *Listeria monocytogenes* (Cuadro 1). La distribución de los positivos a *Salmonella* spp., *E. coli* y *L. monocytogenes* tanto a partir de hisopados rectales como de salivales se muestra en la figura 1. A pesar de que los cuadrantes dos y cuatro concentran el mayor número de positivos de cada patógeno no hay asociación del cuadrante con la prevalencia ($P > 0.05$).

Cuadro 1. Prevalencia de *Salmonella* spp., *E. coli* O157 y *Listeria monocytogenes* a partir de hisopados rectales y bucales de ardillones de acuerdo al sexo.

Parámetro	N	<i>Salmonella</i> spp.			<i>Escherichia coli</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>		
		(+)	(-)	Prevalencia (%)	(+)	(-)	Prevalencia (%)	(+)	(-)	Prevalencia (%)
<i>Hisopado rectal</i>										
Hembras	42	38	4	90.5	6	36	14.3	16	26	38.1
Machos	58	54	4	93.1	4	54	6.9	31	27	53.4
General	100	92	8	92	10	90	10	47	53	47
<i>Hisopado bucal</i>										
Hembras	42	40	2	95.2	0	42	0	16	26	38.1
Machos	58	57	1	98.3	1	57	1.7	30	28	51.7
General	100	97	3	97	1	99	1	46	54	46

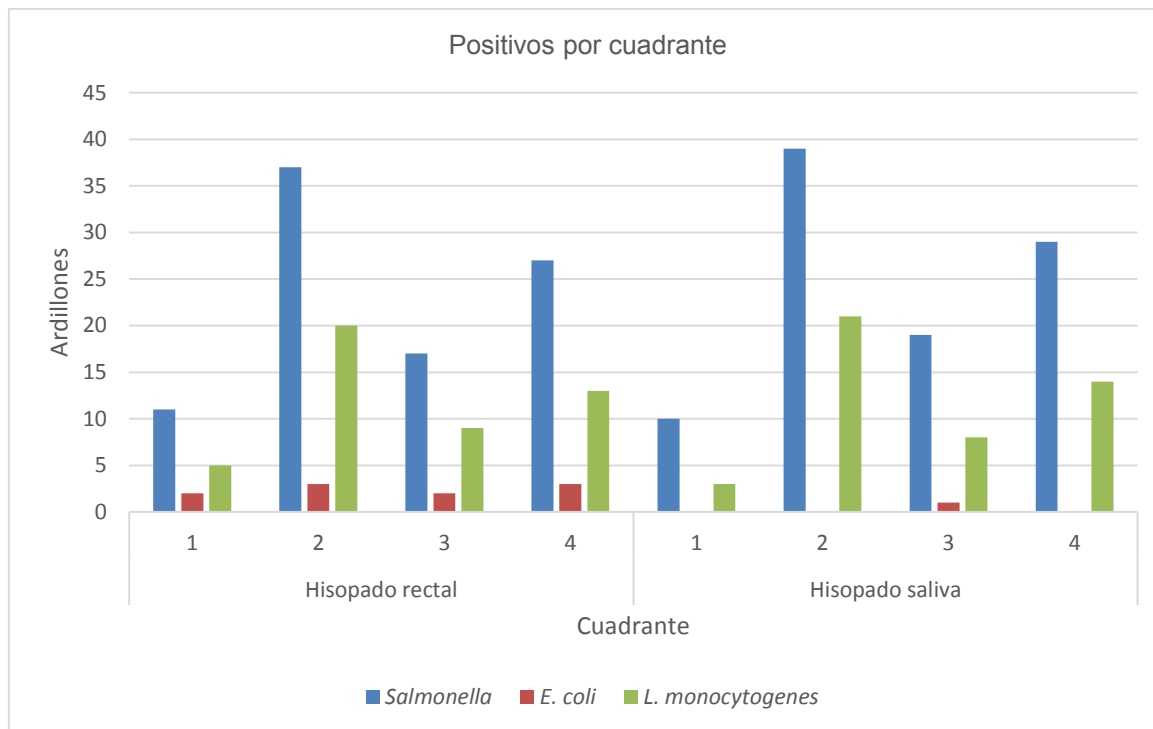


Figura 1. Distribución en los cuadrantes de captura de ardillones positivos a *Salmonella* spp., *E. coli* O157 y *Listeria monocytogenes* a partir de hisopados rectales

CONCLUSIONES

Salmonella spp. *E. coli* O157 y *Listeria monocytogenes* fueron detectados en saliva y heces, encontrándose mayor prevalencia de *Salmonella* spp.; por lo que los ardillones pueden ser considerados como reservorios.

BIBLIOGRAFÍA

- Rodríguez, E. A., de Andrade, D. A. P., Pires, B. C. C., & Víctor, R. A. B. M. *El enfoque ecosistémico en la gestión de las áreas urbanas y peri-urbanas: contribución de la reserva de la biosfera del cinturón verde de la ciudad de São Paulo para la gestión integrada de las ciudades y de sus servicios ambientales*, in *Hacia una cultura de la conservación de la diversidad biológica. Monografías Tercer Milenio, Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza*, G. Halter, G. S., and M. A., Editors. 2007. p. 337-353.
- C.P.G., D.C., *Áreas verdes en las ciudades: nuevas formas de entender la naturaleza urbana*. *Ambienta: la revista del Ministerio de Medio Ambiente*, 2011. 97: p. 46-65.
- Amaya, C., *El ecosistema urbano: simbiosis espacial entre lo natural y lo artificial*. *Revista forestal latinoamericana*, 2005. 37: p. 1-16.
- McDonnell, M.J. and S.T. Pickett, *Ecosystem structure and function along urban-rural gradients: an unexploited opportunity for ecology*. *Ecology*, 1990: p. 1232-1237.
- García-Estrada, C., M. Romero-Almaraz, and C. Sánchez-Hernández, *Comparison of rodent communities in sites with different degrees of disturbance in deciduous forest of southeastern Morelos, Mexico*. *Acta zoológica Mexicana*, 2002(85): p. 153-168.
- Adams, C.E., *Urban wildlife management*. *Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, USA*. 2017.
- Deem, S.L., W.B. Karesh, and W. Weisman, *Putting theory into practice: wildlife health in conservation*. *Conservation biology*, 2001. 15(5): p. 1224-1233.

8. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, *Interventions for the control of non-typhoidal Salmonella spp. in beef and pork: Meeting report and systematic review*. Microbiological Risk Assessment Series 2016. 30.
9. Taylor, M.R., *Will the Food Safety Modernization Act help prevent outbreaks of foodborne illness?* N Engl J Med, 2011. 365(9): p. e18.
10. Oliver, S. P., Patel, D. A., Callaway, T. R., & Torrence, M. E. *ASAS Centennial Paper: Developments and future outlook for preharvest food safety*. Journal of Animal Science, 2009. 87(1), 419-437.
11. Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. *Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations*. Frontiers in microbiology, 2015. 5, 770.
12. Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M. *Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens*. Emerging infectious diseases, 2011. 17(1): p. 7.
13. Olvera R. A. M., López G. C. A., Arteaga S. G., Salas R.L. y Molina V. C. A. Abundancia de arduillos (*Otospermophilus variegatus*) y su potencial de riesgo en salud pública en la Alameda Hidalgo, Querétaro. Reporte final, Municipio de Querétaro, Qro., Octubre, 2017.
14. Urdahl, A. M., Solheim, H. T., Vold, L., Hasseltvedt, V., & Wasteson, Y. *Shiga toxin-encoding genes (stx genes) in human faecal samples*. APMIS, 2013. 121(3): p. 202-10.
15. Kongmuang, U., J. Luk, and A.A. Lindberg. *Comparison of three stool-processing methods for detection of Salmonella serogroups B, C2, and D by PCR*. Journal of clinical microbiology, 1994. 32(12): p. 3072-3074.
16. Soumet, C., Ermel, G., Rose, V., Rose, N., Drouin, P., Salvat, G., & Colin, P. *Identification by a multiplex PCR-based assay of Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses*. Letters in applied microbiology, 1999. 29(1): p. 1-6.
17. Garrido, A., Chapela, M. J., Román, B., Fajardo, P., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. *In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of Salmonella spp., Escherichia coli O157 and Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol, 2013. 164(1): p. 92-8.

CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UNA CEPA SILVESTRE DEL HONGO *PARACONIOETHYRIUM BRASILIENSE*

Marina Arredondo-Santoyo¹, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas², Gerardo Vázquez-Marrufo¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UMSNH. ²División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. UMSNH.

RESUMEN

Paraconiothyrium es un grupo taxonómico de hongos ascomicetes descrito recientemente, por lo que aún se desconoce el potencial biotecnológico de la mayoría de sus especies. En este trabajo se evaluó la capacidad de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium brasiliense* en relación al potencial de detoxificación ambiental, la producción de lacasa extracelular, y el antagonismo contra microorganismos fitopatógenos. Tanto el micelio de la cepa metabólicamente activo como el micelio inactivado mediante esterilización, decoloró eficientemente (más de 95%) en medio líquido de caldo papa dextrosa (PDB) a los colorantes Azul Directo 71, Azul Remazol Brillante R y Azul Cielo Chicago, mostrando baja eficiencia para remover el colorante Fucsina Ácida (65% y 12%). Dichos resultados indican que la cepa emplea mecanismos de degradación enzimática y bioadsorción en la remoción de colorantes fenólicos. Al tratar agua residual de la industria papelera con micelio activo e inactivado de la cepa se observa una reducción del color del 11% y 13% en 3 y 10 días de incubación, respectivamente; la baja eficiencia puede estar relacionada posiblemente con la toxicidad del efluente hacia el hongo. La máxima actividad extracelular de lacasa fue de 46.8 (± 0.33) U/L en medio PDB suplementado con 150 μM CuSO_4 , enzima posiblemente involucrada en la decoloración observada con micelio metabólicamente activo. Los ensayos de confrontación en cultivos duales y de inhibición de crecimiento en medio sólido agar dextrosa papa (PDA) muestran que la cepa puede antagonizar *in vitro* a oomicetes y hongos fitopatógenos de los géneros *Phytophthora* y *Colletotrichum*, respectivamente; aunque no muestra la misma eficiencia para antagonizar a especies del género *Fusarium*. Los resultados muestran que la cepa CMU-196 de *P. brasiliense* tiene amplio potencial para la detoxificación de compuestos fenólicos y el biocontrol de microorganismos fitopatógenos, lo que garantiza estudios posteriores para conocer los mecanismos empleados en estos procesos.

INTRODUCCIÓN

Paraconiothyrium es un grupo taxonómico relativamente reciente de hongos ascomicetes que al momento de su descripción se conformó por las especies *P. estuarinum*, *P. brasiliense*, *P. cyclothyrioides*, y *P. fungicola* (Verkley *et al.*, 2004). El análisis filogenético empleando regiones de rDNA demostró que el género *Paraconiothyrium* se encuentra dentro del grupo de los *Pleosporales* y es filogenéticamente distante de los miembros típicos de otros géneros de Coelomycetes como *Leptosphaeria* y *Helminthosporium*. Nuevas especies de *Paraconiothyrium* han sido descritas posteriormente a la introducción del género, incluyendo a *P. estuarinum*, *P. cyclothyrioides*, *P. cyclothyrioides*, así como varios aislados geográficos de *P. variable* (Damm *et al.*, 2008). A partir de su descripción, estudios posteriores han demostrado el amplio potencial biotecnológico de algunas especies y cepas del género *Paraconiothyrium*. Así, se ha documentado que extractos del micelio de una cepa de especie no identificada posee propiedades antimicrobianas (Zhou *et al.*, 2011), y que el crecimiento del micelio en presencia de acetato de etilo induce la producción de metabolitos con actividad antioxidante y antiproliferativa de células humanas relacionadas con el desarrollo de psoriasis (de Carvalho *et al.*, 2012). En particular, de cepas del género se han obtenido y caracterizado sustancias con propiedades farmacológicas que incluyen furanonas (Almeida *et al.*, 2014), se ha reportado la producción de taxol, fármaco anticancérgeno, por parte de *P. variable* (Somjai peng *et al.*, 2016). Aunado al potencial farmacológico en relación a salud humana, se ha encontrado que tanto *P. brasiliense* (Lui *et al.*, 2010) como *P. variable* (Combes *et al.*, 2012) producen metabolitos antifúngicos eficientes *in vitro* contra hongos fitopatógenos, y que *P. hawaiiense* es un entomopatógeno (Chen *et al.*, 2014), lo que sugiere potencial para su uso como herramientas de biocontrol para la protección de cultivos de relevancia agrícola. En relación a la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares, se ha purificado y caracterizado una lacasa (Lac)

extracelular de *P. variable* (Forootanfar *et al.*, 2011), la cual presenta una gran capacidad para la remoción de derivados clorofenólicos (Forootanfar *et al.*, 2012) y para decolorar tintes sintéticos (Aghaie-Khouzani *et al.*, 2012; Ashrafi *et al.*, 2013). Sin embargo, a la fecha no se ha reportado dicha actividad ligninolítica en ninguna otra especie del género.

Los estudios de caracterización bioquímica y fisiológica de cepas silvestres de especies fúngicas bien identificadas taxonómicamente contribuyen a tener un mejor entendimiento de su papel ecológico en los ecosistemas de donde provienen, al mismo tiempo que permiten evaluar su potencial biotecnológico. Esto es particularmente importante en especies de grupos taxonómicos recientemente descritos, como el caso del género *Paraconiothyrium*, de los cuales aún se ignoran muchos aspectos de su biología básica. Dada la diversidad de estilos de vida, la reciente documentación del potencial biotecnológico y la importancia agrícola y en salud pública de las especies dentro del género *Paraconiothyrium*, la caracterización de cepas obtenidas de distintas regiones geográficas cobra relevancia tanto desde el punto de vista científico como tecnológico. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar el potencial biotecnológico de una cepa de *Paraconiothyrium brasiliense* para aspectos de detoxificación ambiental y control biológico.

PARTE EXPERIMENTAL

Se empleó la cepa CMU-196 depositada en el Cepario Michoacano Universitario (CMU) del Laboratorio de Biotecnología y Conservación de Microorganismos de la UMSNH. El medio Agar Papa y Dextrosa se empleó para el cultivo y mantenimiento del micelio vegetativo y la obtención de inóculos. El medio caldo del mismo se utilizó para elaborar las cinéticas de crecimiento en medio líquido y para los ensayos de decoloración.

Para el ensayo de decoloración de colorantes sintéticos se emplearon cultivos líquidos suplementados independientemente con Fucsina ácida (FA), Azul Remazol Brillante R (ARBR), Azul Cielo Chicago (ACC) y Azul Directo 71 (AD71) a una concentración 150 mg/mL, los cuales fueron inoculados con la cepa de estudio incubándose a 24 °C con agitación de 120 rpm. Para analizar la decoloración de agua residual (AR), la muestra de agua fue colectada de un cárcamo de desagüe de una industria papelería local. En éste último caso se colocaron 50 mL de AR y sobre esta la cepa fue inoculada. Con la finalidad de evaluar la decoloración global llevada a cabo por el hongo se realizaron ensayos con micelio metabólicamente activo y con micelio inactivado mediante esterilización en autoclave a 121 °C (15 lb/in²) por 15 min. Se evaluó el decremento de absorbancia específica para cada uno de los colorantes, la degradación de compuestos fenólicos presentes en el AR fue determinada a 280 nm.

La actividad extracelular de lacasa (LAC) se determinó tanto en condiciones de cultivo basal como de inducción. Durante 15 días se tomaron alícuotas de 1.5 mL cada 24 h del medio líquido extracelular en ambas condiciones de cultivo y se centrifugó a 750 x *g* durante 5 min para eliminar restos de micelio. La actividad extracelular de LAC se determinó midiendo la oxidación del ABTS a 420 nm (Nagai *et al.*, 2002). La mezcla de reacción estaba compuesta por 50 mM de buffer Macllvaine pH 4.0, 1mM de ABTS (2, 2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina- 6- sulfonato) y 100 µL de la fase acuosa del medio de cultivo centrifugado. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 20 min y la reacción se detuvo añadiendo 0.5% (v/v) en solución acuosa de ácido tricloroacético. La formación del radical catiónico se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). Los valores de actividad fueron expresados en unidades de actividad enzimática (U) la cual expresa la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo, tomando en cuenta un volumen de reacción de 1 mL en todos los casos.

Las cepas de los microorganismos fitopatógenos utilizadas en los ensayos de micoparasitismo incluyen cuatro especies de hongos y dos especies de oomycetes del género *Phytophthora*. Para evaluar la actividad antagónica de la cepa CMU-196 se utilizó la técnica de Cherif (1990). Para cada experimento se inoculó en un extremo a la cepa CMU-196 permitiendo el desarrollo de la colonia a 24 °C durante 5 días y en el otro extremo se inocularon de manera independiente las distintas especies de fitopatógenos. Las cepas se incubaron a 24 °C, en oscuridad. Para los ensayos de inhibición se utilizó el método del papel celofán (Dennis y Webster, 1971), incubándose a 24 °C y midiendo cada 24 h el diámetro del crecimiento radial. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron por triplicado, los datos obtenidos se promediaron y se determinó la desviación estándar de los resultados obtenidos.

RESULTADOS

En la figura 1A se muestran los patrones de decoloración de las soluciones de colorantes sintéticos con micelio metabólicamente activo. La solución de los colorantes AD71 y ARBR fue decolorada en un 100%, llegando a cero la absorbancia inicial a los días cuatro y cinco, respectivamente, mientras que para el colorante ACC la decoloración fue del 96% al séptimo día. El tinte FA fue decolorado a partir del tercer día de tratamiento, mostrando una pendiente de decoloración con una reducción gradual del valor de absorbancia inicial hasta llegar a un 63% el día diez.

La decoloración efectuada con micelio inactivado inició en todos los casos entre el primer y segundo día de incubación (figura 1B). Después de este periodo los valores de absorbancia prácticamente no mostraron modificaciones hasta el final de la cinética. La eficiencia de remoción de los colorantes FA y ARBR fue menor a la encontrada en los ensayos con micelio activo, ya que mientras que en el primer caso el porcentaje de decoloración alcanzado en estos ensayos fue de 13%, en el segundo caso fue de 59%. Los colorantes ACC y AD71 fueron removidos eficientemente de la solución acuosa por el micelio inactivado, en un 95%.

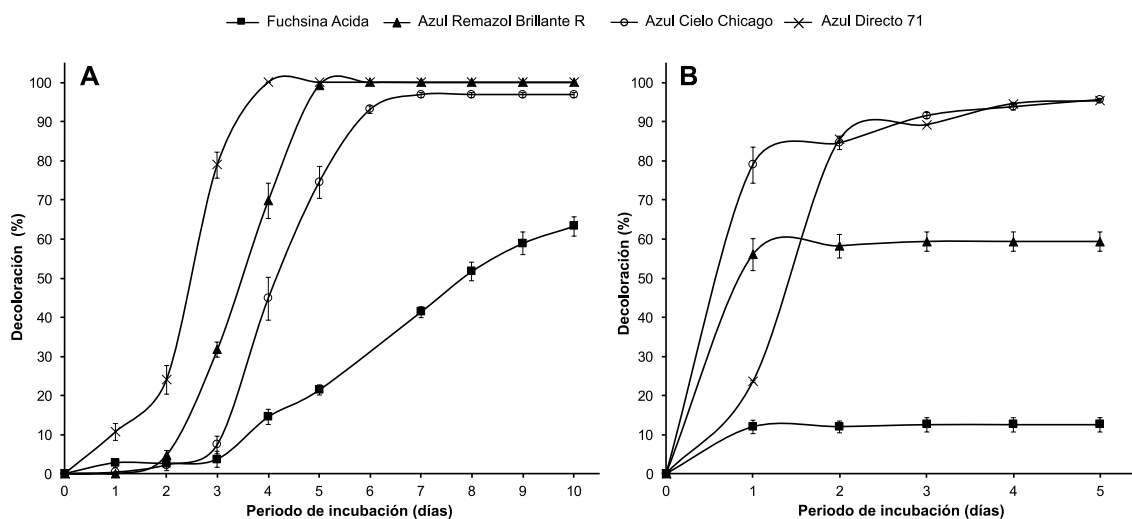


Figura 1. Decoloración de soluciones acuosas de colorantes sintéticos por parte de la cepa CMU-196. Se muestran las cinéticas de decoloración con micelio metabólicamente activo (Panel A) y con micelio inactivado en autoclave (Panel B).

Los porcentajes finales de aclaramiento de AR encontrados tanto para el micelio activo como para el inactivado fueron similares, con valores de 13% y 11% respectivamente. Sin embargo, las cinéticas de decoloración generadas en cada ensayo fueron diferentes (figura 2). Así, en el caso del tratamiento con micelio metabólicamente activo la disminución de absorbancia fue gradual desde el primero hasta el décimo día de incubación. En la decoloración llevada a cabo por micelio inactivado se observa una disminución de la absorbancia desde el primer hasta el tercer día de incubación, periodo en el que el porcentaje de aclaramiento alcanzó el 11%.

En relación a la producción de biomasa y determinación de actividad extracelular de LAC, la biomasa producida en medio líquido basal y en presencia de CuSO_4 fue similar en cada punto de muestreo hasta el final del periodo de incubación, no habiendo diferencia significativa en la velocidad de crecimiento y mostrando una fase log media después de tres días de incubación en ambas condiciones (figura 3). La biomasa total obtenida fue de 88 mg y 80 mg en el último día de la cinética para el medio control y el suplementado con cobre, respectivamente. En condiciones de basales de incubación la actividad extracelular de LAC fue muy baja o indetectable durante todo el periodo de incubación. Sin embargo, en presencia de CuSO_4 se pudo medir la actividad desde el día dos hasta el término del periodo de incubación, presentando un pico máximo de $46.8 (\pm 0.33)$ U/L al final de la fase logarítmica de crecimiento el día cinco (figura 3). Dicho pico corresponde a un incremento de aproximadamente 46 veces con respecto a la basal. Después de alcanzar el máximo se observa un

decremento gradual en la actividad de LAC que concluye con $7.6 (\pm 0.79)$ U/L de actividad el décimo día.

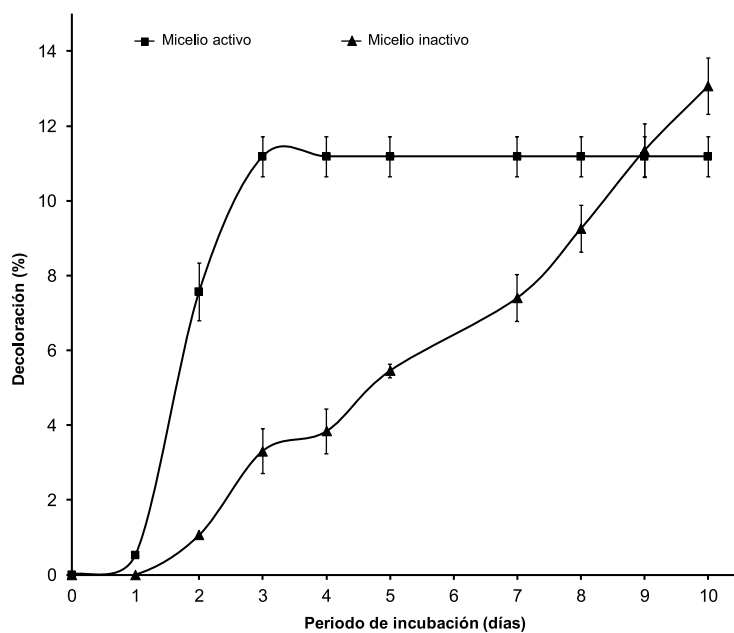


Figura 2. Aclaramiento de agua residual de la industria papelera por parte de la cepa CMU-196. Se muestran las cinéticas de aclaramiento con micelio metabólicamente activo y con micelio inactivado.

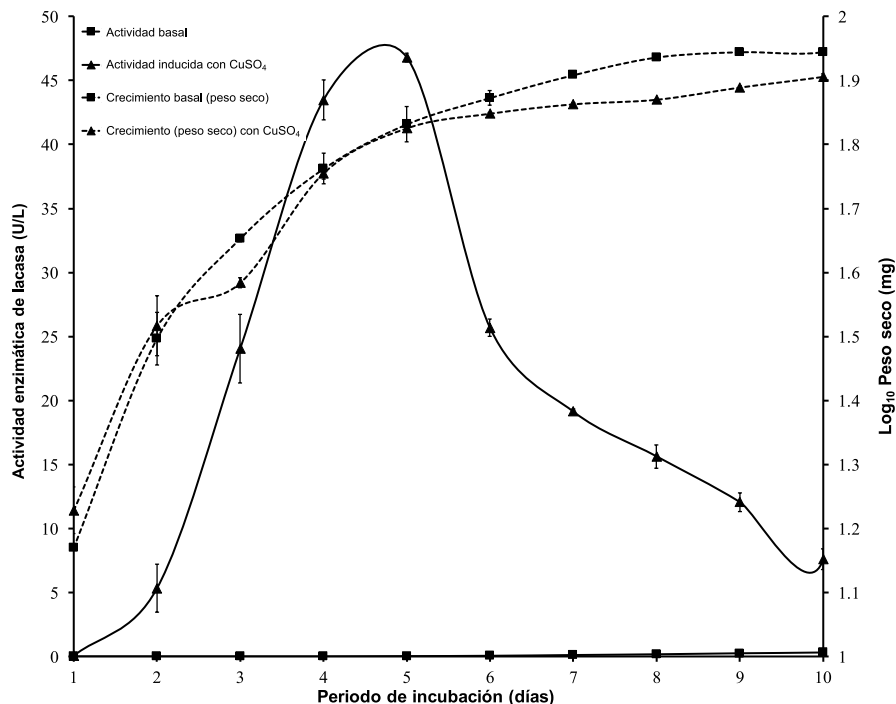


Figura 3. Cinética de crecimiento y actividad extracelular de LAC de la cepa CMU-196. Se muestra la cinética de crecimiento y la actividad extracelular de Lac en condiciones basales de incubación en medio PDB y en el mismo medio suplementado con CuSO₄ (150 μM). Los cultivos se incubaron a 24 °C y 120 rpm.

Los ensayos de confrontación en cultivos duales y de inhibición de crecimiento por producción de metabolitos extracelulares hidrosolubles muestran que la cepa puede antagonizar eficientemente *in vitro* a oomicetes y hongos fitopatógenos de los géneros *Phytophthora* y *Colletotrichum*, respectivamente; aunque no muestra la misma eficiencia para antagonizar a especies del género fúngico *Fusarium*, particularmente a *F. Mexicanum* (figura 4).

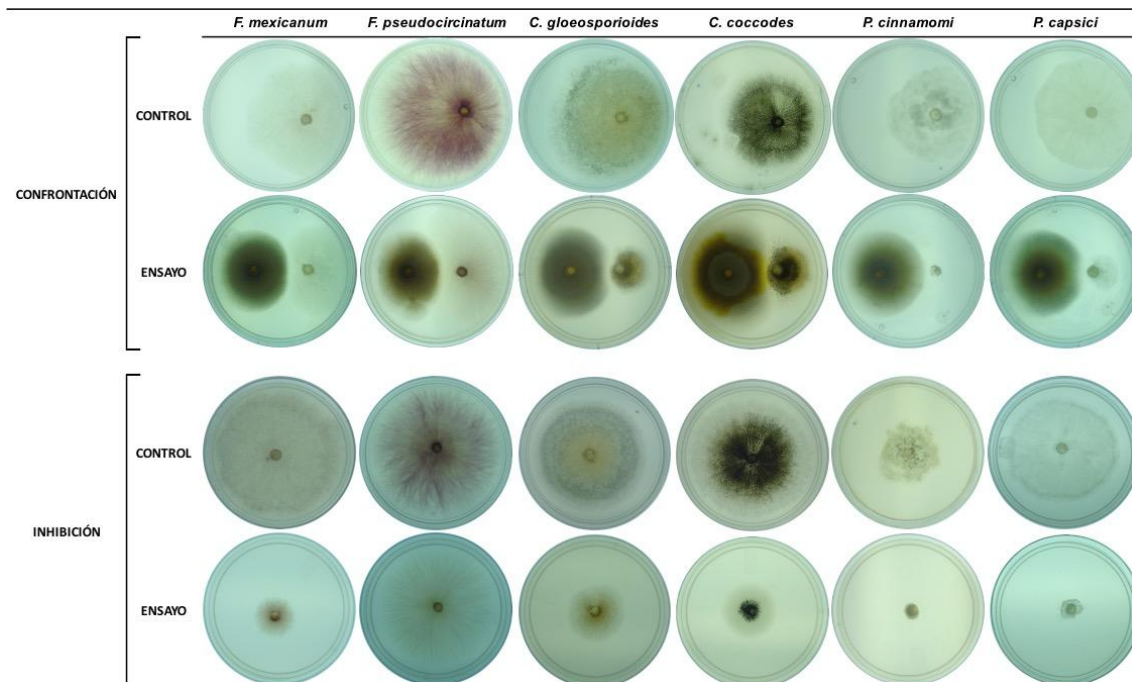


Figura 4. Antagonismo e inhibición de crecimiento de hongos y oomicetes fitopatógenos por parte de la cepa CMU-196. Los ensayos se realizaron en medio AEM a 28 °C. En el caso de los ensayos de confrontación, del lado izquierdo de cada placa se inoculó a la cepa CMU-196 y del lado derecho al fitopatógeno de prueba que se especifica en cada columna. Para los ensayos de inhibición las cepas de fitopatógenos se incubaron en la misma placa con medio en el cual había pre-crecido sobre papel celofán la cepa CMU-196, retirándose para inocular a cada uno de estos.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la cepa CMU-196 de *P. brasiliense* tiene un amplio potencial biotecnológico, lo que garantiza estudios posteriores para conocer los mecanismos empleados para la detoxificación ambiental y el antagonismo contra fitopatógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aghaie-Khouzani, M., Forootanfar, H., Moshfegh, M., Khoshayand, M. R., & Faramarzi, M. A. (2012). Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochemical Engineering Journal*. 60: 9–15.
2. Almeida, C., El Aouad, N., Martín, J., Pérez-Victoria, I., Gonzalez-Menendez, V., Platas, G., Cruz, M., Monteiro, M. C., de Pedro N, Bills, G. F., Vicente, F., Genilloud, O., Reyes, F. (2014). Graminin B, a furanone from the fungus *Paraconiothyrium* sp. *Journal of Antibiotics*. 67(5): 421.
3. Ashrafi, S. D., Rezaei, S., Forootanfar, H., Mahvi, A. H., Faramarzi, M. A. (2013). The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variabile*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 85: 173-181.
4. Chen, S., Zhang, Y., Zhao, C., Ren, F., Liu, X., & Che, Y. (2014). Hawaiiinolides E–G, cytotoxic cassane and cleistanthane diterpenoids from the entomogenous fungus *Paraconiothyrium hawaiiense*. *Fitoterapia*. 99: 236-242.

5. Chérif, M. (1990). Cytochemical Aspects of Chitin Breakdown During the Parasitic Action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*. 80(12): 1406.
6. Combés, A., Ndoye, I., Bance, C., Bruzard, J., Djediat, C., Dupont, J., Nay, B., Prado, S. (2012). Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS One*. 7(10): e47313.
7. Damm, U., Verkley, G. J. M., Crous, P. W., Fourie, P. H., Haegi, A., & Riccioni, L. (2008). Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia*. 20(1): 9–17.
8. de Carvalho, P. L. N., Amaral, P. O., Ruiz, A. L. T. G., de Alencar, S. M., Pfenning, L. H., de Carvalho, J. E., Rosalen, P. L., & Ikegaki, M. (2012). *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: antioxidant and antiproliferative activities of endophytic fungus associated with *Rheedia brasiliensis* plant. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. 1(3): 172–176.
9. Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*. 57(1): 25–39.
10. Forootanfar, H., Faramarzi, M.A., Shahverdi, A.R., Tabatabaei Yazdi M. (2011) Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Bioresource Technology*. 102: 1808–1814.
11. Forootanfar, H., Movahednia, M. M., Yaghmaei, S., Tabatabaei-Sameni, M., Rastegar, H., Sadighi, A., & Faramarzi, M. A. (2012). Removal of chlorophenolic derivatives by soil isolated ascomycete of *Paraconiothyrium variabile* and studying the role of its extracellular laccase. *Journal of Hazardous Materials*. 209–210: 199–203.
12. Liu, C., Liu, T., Yuan, F., & Gu, Y. (2010). Isolating endophytic fungi from evergreen plants and determining their antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research*, 4(21): 2243–2248.
13. Nagai M., Sato T., Watanabe H., Saito K., Kawata M., Enei H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3): 327–335.
14. Somjai peng, S., Medina, A., & Magan, N. (2016). Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paraconiothyrium variabile* and *Epicoccum nigrum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 90: 69-75.
15. Verkley, G. J. M., Da Silva, M., Wicklow, D. T., & Crous, P. W. (2004). *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*. 50: 323–335.
16. Zhou, Y., Zhang, Y., Li, J., Meng, X., Zhao, J., He, W., & Zhou, L. (2011). Antibacterial and antioxidant activities of the endophytic fungi from medicinal herb *Trillium tschonoskii*. *African Journal of Microbiology Research*. 5(27): 4917-4921.

DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA, SECUNDARIA Y TERCIARIA DE LA INVERTASA DE *CANDIDA GUILLIERMONDI* MPIIIA

Karina Luna de Jesús¹, María del Sugeyrol Villa Ramírez¹, José Alejandro Santiago Hernández², María Eugenia Hidalgo Lara² y Miguel Ángel Plascencia Espinosa¹

¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional,

²Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN.

RESUMEN

Las invertasas son un grupo bioquímicamente diverso de enzimas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa. A pesar de la relevancia histórica de la invertasa como modelo para entender la cinética enzimática, existe poca información con respecto a la estructura y organización de invertasas provenientes de géneros distintos a *Saccharomyces*. En el presente trabajo se reporta la caracterización de la invertasa de *Candida guilliermondi* MPIIIA, la cual es un dímero con un peso molecular (PM) de 463 kDa y está compuesto por dos subunidades idénticas de 243 kDa. El gen que codifica para la enzima tiene un ORF de 1545 nucleótidos que codifican para un polipéptido de 514 aminoácidos. A partir de la enzima purificada se secuenciaron fragmentos peptídicos mediante espectrometría de masas, los cuales presentaron una homología de 97% con fragmentos del gen SUC4 de *S. cerevisiae*. A partir del ORF que codifica para la enzima se llevó a cabo un análisis para deducir la secuencia de aminoácidos y se identificaron algunas regiones como la huella de la familia 32 de las glicosil hidrolasas (AFTPSHGWMNDPNG), y un péptido señal de 18 aminoácidos con sitio de corte entre S18 y S19. La estimación del contenido de estructura secundaria fue realizada por Dicroísmo Circular. De acuerdo con el análisis por medio del algoritmo CONTINLL, la invertasa podría estar caracterizada por un 47% de estructura lámina beta, 23% de giros y 30% de espirales al azar. Para la predicción de la estructura tridimensional de la enzima se empleó la plataforma I-TASSER. El modelo tridimensional presentó la mayor similitud estructural con la invertasa de la levadura *Schwanniomyces occidentalis*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen al conocimiento general de la estructura y conformación de una de las enzimas con una relevancia industrial y científica como son las invertasas.

INTRODUCCIÓN

Las invertasas (EC.3.2.1.26) o β -fructofuranosidasas son un grupo bioquímicamente diverso de enzimas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa irreversiblemente (Acosta y col., 2000; Farci y col., 2016; Pek y col., 2015; Veana y col., 2011). Son enzimas que tienen una amplia gama de aplicaciones comerciales y biotecnológicas en bebidas, en la producción de confitería con centro líquido o blando, en la fabricación de caramelos y conservas, en panadería, en producción de ácido láctico, glicerol y etanol a partir de la fermentación de la melaza de caña de azúcar, en la preparación de azúcar invertido y jarabe de alta fructosa a partir de sacarosa. También tiene aplicaciones en la industria cosmética y la industria farmacéutica (Ghasemi y col., 2014, Kulshrestha, y col., 2013, Rustiguel y col., 2011).

En México la importación de enzimas y preparaciones enzimáticas, entre las que se encuentra la invertasa, ha aumentado en los últimos años, del año 2012 al año 2017 se observó un aumento de hasta un 14.6% de acuerdo al Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI) de la Secretaría de Economía. Se prefieren las enzimas en la industria azucarera para operar de manera estable a temperaturas relativamente altas (55-70 °C) en soluciones de sustrato concentrado (aproximadamente 60% p/v) (Menéndez y Col., 2013). Las características de la invertasa comercial de *Saccharomyces* la hacen poco eficiente en los sistemas en los cuales se aplica. Esta reportado que esta invertasa es inhibida a una concentración de sustrato (sacarosa) de 150 mM, lo cual representa una limitante, debido a que los sustratos a los cuales se agrega invertasa poseen una alta concentración de azúcares, que va en un rango de 1 a 2 M (Vázquez-Bahena et al., 2004; Chaplin y Bucke, 1990).

En la búsqueda de enzimas con propiedades más afines a las empleadas en la industria, se llevó a cabo un escrutinio de un grupo particular de levaduras, llamadas levaduras osmotolerantes para aislar e identificar invertasas capaces de funcionar en medios con altas concentraciones osmóticas y que sean activas en un amplio rango de valores de pH. A partir de este escrutinio se seleccionó

una levadura denominada MpIIIa, la cual mostró una alta actividad sacarolítica asociada al paquete celular. MpIIIa fue posteriormente identificada mediante técnicas moleculares como *Candida guilliermondii* por la empresa Accugenix. Cuando se comparó la preparación enzimática de aplicación en confitería contra enzimas comerciales, se encontró que esta enzima posee una alta estabilidad a temperatura y pH (Espinosa-Enríquez, 2008). A pesar de que la invertasa de esta levadura ha sido objeto de estudios biotecnológicos, aún no se han llevado a cabo estudios a nivel molecular del gen codificante para esta enzima.

PARTE EXPERIMENTAL

MICROORGANISMO

C. guilliermondii MpIIIa fue obtenida a partir de la colección de cultivos del CINVESTAV (CDBB - CINVESTAV, México. Cepa No. CDBB-L-1254). Para su conservación, células de la levadura fueron suspendidas en una solución de glicerol al 30% (p/v) y mantenidas a -70°C. Su propagación se realizó mediante siembra en placa en medio sólido YM con una concentración de glucosa o sacarosa de 40% (p/p).

Purificación de la invertasa de C. guilliermondii MpIIIa

Para la purificación de la invertasa de *C. guilliermondii* MpIIIa, se cultivaron células en matraces Fernbach de 2.4 L con 600 mL de medio de cultivo descrito por Casarrubias-Segura (2003). La levadura *C. guilliermondii* MpIIIa fue propagada a 30°C durante 72 h a 200 rpm.

Las células fueron colectadas por centrifugación (8,000 rpm, a 4°C durante 5 min) y resuspendidas en 900 mL de una solución amortiguadora D, que contenía por litro: MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, (NH₄)₂SO₄ 0.3M, fluoruro de fenil metil sulfonil (PMSF) 1 mM, ditioneitol (DTT) 1mM, azida de sodio 0.2% (p/v) y glicerol 5% (p/v) en Tris-HCl 0.2 M, pH 7.9 (Mullan et al., 1991). Todos los pasos subsecuentes se llevaron a cabo a 4°C.

Posteriormente, las células resuspendidas fueron lisadas mediante el empleo de una prensa francesa (Aminco, Maryland, USA) a 500 PSIG y el extracto crudo obtenido fue ultrafiltrado mediante el protocolo descrito por Espinosa-Enríquez (2008), a través de una membrana de celulosa regenerada Ultracell de Millipore con límite de exclusión de 30 kDa. La fracción concentrada, superior a 30 kDa, retuvo la mayor cantidad de actividad de invertasa y fue aplicada a una columna de intercambio aniónico Unosphere Q, (BioRad) de 0.7 x 15 cm, acoplada a un Cromatógrafo BioLogic HR (BioRad).

Análisis electroforético de la invertasa (INV3a)

Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) fueron llevados a cabo por el método descrito por Laemmli (1970). La detección de proteínas se realizó por tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250 (BioRad) o mediante tinción con plata, usando el sistema "Silver Stain Plus Kit" (BioRad). Para la detección de glicoproteínas en geles de poliacrilamida, se empleó tinción Schiff de acuerdo al protocolo descrito por Segrest y Jackson (1972).

Determinación del PM de la invertasa INV3a y contenido de carbohidratos

El PM de INV3a, fue determinado mediante filtración en gel empleando una columna HiPrep 16/60 S-300 (Sephacryl, GE Healthcare) adaptada a un sistema de cromatografía AKTA FLPC (GE Healthcare), a un flujo de 0.5 mL / min. Se empleó buffer de fosfato de sodio 50 mM, pH 6.8. Para estimar el PM se empleó un kit para determinación de proteínas de alto PM (HMW Calibration Kit, GE).

Análisis de dispersión dinámica de luz (Dynamic light scattering)

Para estimar el PM y determinar el estado oligomérico de la invertasa INV3a, preparaciones de la enzima se analizaron por dispersión de luz (Dynamic Light Scattering). El análisis se llevó a cabo usando un analizador de UV Zetasizer para muestras líquidas (Malvern Instruments, UK).

Estimación del contenido de estructura secundaria por Dicroísmo Circular (CD)

Los análisis fueron llevados a cabo en un espectropolarímetro Jasco Modelo J-715 (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón). Los espectros de CD entre 200 y 260 nm fueron obtenidos usando una velocidad de escaneo de 50 nm / min a un tiempo de respuesta de 8 seg y un ancho de banda de 1.0 nm. Cada espectro presentado es un promedio de 5 lecturas independientes. Los datos de CD fueron graficados como elipticidad (en grados centímetro cuadrado por decímetro) versus longitud de onda con suavizado.

Secuenciación de fragmentos peptídicos de la invertasa purificada por Espectrometría de Masas (MS).

Para la secuenciación de la enzima purificada, primero se aplicó un tratamiento con EndoH (Roche). Se mezclaron 1.45 mg de enzima purificada INV3a y 500 mU of EndoH en buffer acetatos 50 mM, pH 5.0 y la mezcla se incubó a 37°C durante 16 h. Posteriormente, se corrieron 3 carriles con 20 µL de enzima cada uno en un gel de poliacrilamida al 10%. El gel se tiñó con azul de Coomassie y las bandas de aproximadamente 63 kDa se recortaron, se lavaron con agua destilada estéril y se enviaron a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM y a la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica para determinar su identidad y la secuencia parcial de aminoácidos por Espectrometría de Masas.

Predicción de la estructura terciaria de INV3a

A partir de la información obtenida de la secuenciación del gen *inv3a* y de la secuencia deducida de aminoácidos generada en base a la secuencia del ORF del gen, se realizó una predicción de la estructura tridimensional de INV3a. Se empleó la plataforma on line ITASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), la cual, mediante alineamientos múltiples de la secuencia problema con proteínas de las cuales existe estructura terciaria obtenidas experimentalmente, permite obtener estructuras tridimensionales similares. Posteriormente, estos fragmentos homólogos son unidos y en los casos en donde hay modelos apropiados, el programa construye toda la estructura.

*Aislamiento de DNA genómico de *C. guilliermondii* MpIIIa*

La obtención de DNA genómico de *C. guilliermondii* MpIIIa se realizó empleando del kit YeaStar (Zymo Research). Para verificar la concentración e integridad del DNA extraído, muestras del material se analizaron en geles de agarosa al 1%.

*Obtención de la secuencia que codifica para la invertasa de *C. guilliermondii* MpIIIa*

Se diseñaron dos iniciadores reversos y uno directo basados en la secuencia parcial de la invertasa INV3a y adicionalmente, se diseñaron nuevamente iniciadores degenerados a partir de un alineamiento con secuencias de invertasas reportadas en literatura, empleando la base de datos UniProtKB (www.uniprot.org). Mediante la combinación de oligonucleótidos INV-D31 e INV-R31 se amplificó por PCR de un fragmento de aproximadamente 750 bp, empleando como templado DNA genómico de *C. guilliermondii* MpIIIa. El fragmento obtenido mediante este protocolo fue purificado empleando el protocolo del manual "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen) y posteriormente secuenciado en UBIPRO, FES Iztacala, UNAM. A partir de la secuencia obtenida, se diseñaron oligos para obtener las secuencias adyacentes a la secuencia conocida mediante el empleo de la técnica "Genome walking" o "Chromosome walking" usando el Kit universal Genome Walker (Clontech).

RESULTADOS

*Purificación de la invertasa de *C. guilliermondii* MpIIIa*

La invertasa INV3a de la levadura *C. guilliermondii* MpIIIa se purificó a partir de la fracción soluble del lisado celular, mediante ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico. Se detectó un pico de actividad de invertasa en las fracciones 8 a 25, alcanzándose un máximo de actividad enzimática en la fracción 16. Las fracciones 13 al 20 se reunieron, se dializaron con buffer de Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, glicerol (5% p/v) y PMSF 0.1 mM. Posteriormente, esta preparación fue analizada en geles de poliacrilamida - SDS al 10%. En la tabla 1 se presenta un resumen de los resultados obtenidos durante la purificación de INV3a

Tabla 1. Purificación de la invertasa de *C. guilliermondii* Mp11a

Purificación de la invertasa de <i>C. guilliermondii</i> Mp11a					
Etapa	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
Lisado crudo	729	200,585	275	1	100
Ultrafiltración (30 kDa)	516	103,875	2,013	7	52
Cromatografía de intercambio aniónico	0.34	26,537	78,050	283	13
Ultrafiltración (50 kDa)	0.26	21,327	82,027	298	11

Análisis electroforético de la invertasa purificada (INV3a).

La enzima purificada (INV3a) se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie (Fig. 1A) o tinción con plata (Fig. 1B). Se observó que INV3a generó un patrón de corrimiento difuso (Fig. 1A, carril 2 y Fig. 1B, carril 1), que de acuerdo a la literatura (Orlean et al., 1991), es típico de proteínas altamente glicosiladas. Para determinar si INV3a se encontraba glicosilada, la enzima purificada se analizó en geles de poliacrilamida teñidos con reactivo de Schiff. INV3a mostró un patrón de tinción similar al observado en los geles teñidos con plata y Coomassie (Fig. 1C, carril 1). Este resultado es indicativo de que INV3a está glicosilada, por lo cual no es posible estimar su peso molecular mediante electroforesis.

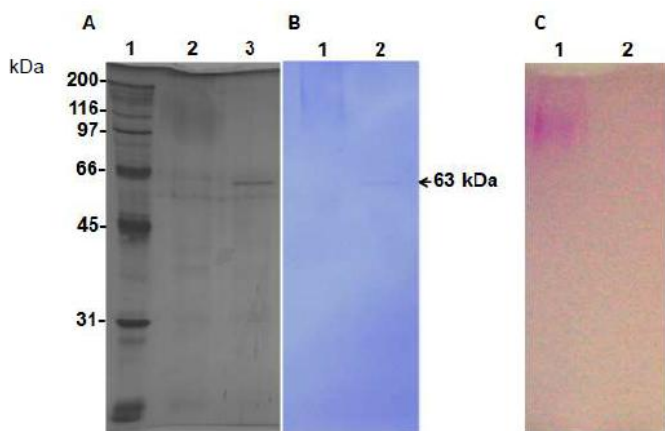


Figura 1. Análisis electroforético de INV3a purificada, nativa y desglicosilada con EndoH. A) Gel teñido con Azul de Coomassie R-250; línea 1, marcadores de PM; línea 2, INV3a; línea 3, INV3a/ EndoH. B) Gel teñido con plata; línea 1, INV3a; línea 2, INV3a / EndoH. C) Gel teñido con Schiff; línea 1, INV3a; línea 2, INV3a/ EndoH.

Para confirmar que la INV3a es una glicoproteína, la enzima purificada se digirió con EndoH, y los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Se observó una sola banda con un peso molecular aproximado de 63 kDa (Fig. 1A, carril 3 y Fig. 1B, carril 2). De acuerdo a lo esperado, cuando INV3a fue desnaturalizada y tratada con EndoH, no se detectó ninguna banda en geles de poliacrilamida teñidos con Reactivo de Schiff (Fig. 1C, carril 2). Los resultados obtenidos indican que la invertasa INV3a es una glicoproteína y que está integrada, cuando menos, por una subunidad de aproximadamente 63 kDa, el PM estimado cuando ésta se encuentra desglicosilada.

Estimación de peso molecular y estado oligomérico de INV3a

Para estimar el PM de INV3a y determinar su estado oligomérico, la enzima purificada se analizó por cromatografía de filtración en gel, bajo condiciones nativas y desnaturalizantes (urea 6 M). La invertasa INV3a presentó un tamaño estimado de 463 kDa (Fig. 2A); mientras que bajo condiciones desnaturalizantes, en la presencia de urea 6 M, se obtuvo un pico con un tamaño estimado en 243

kDa (Fig. 2B), lo cual indica que INV3a es un dímero con un tamaño de aproximadamente 463 kDa, compuesto por dos subunidades idénticas de 243 kDa.

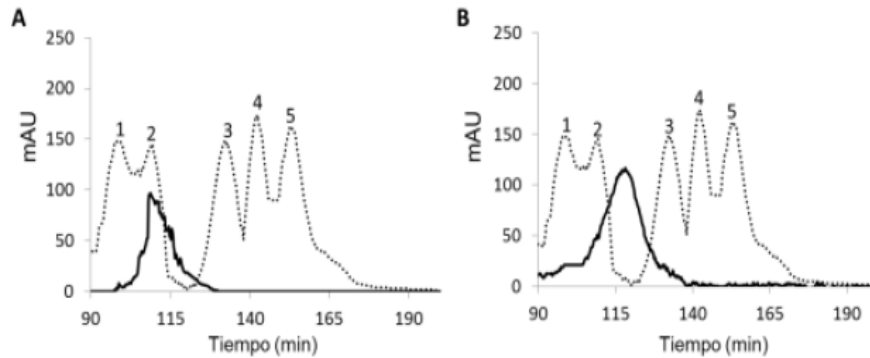


Figura 2. Cromatografía de filtración en gel de INV3a bajo condiciones nativas (A) y desnaturalizantes (urea 6M) (B) para la estimación del PM. Estándares de PM: 1, Tiroglobulina (669 kDa); 2, Ferritina (440 kDa); 3, Aldolasa (158 kDa); 4, Conalbúmina (75 kDa); 5, Ovalbúmina (43 kDa). La absorbancia a 280 nm esta expresada en unidades de miliabsorbancia (mAU).

Análisis de INV3a por dicroísmo circular (CD)

Los espectros de CD de UV lejano son mostrados en la figura 3. Se observa que INV3a presenta un pico negativo centrada alrededor de los 210 nm. De acuerdo con el análisis por medio del algoritmo CONTINLL (Provencher y Gloeckner, 1981; van Stokkum et al., 1990), INV3a podría estar caracterizada por un 47% de estructura lámina beta, 23% de giros y 30% de espirales al azar.

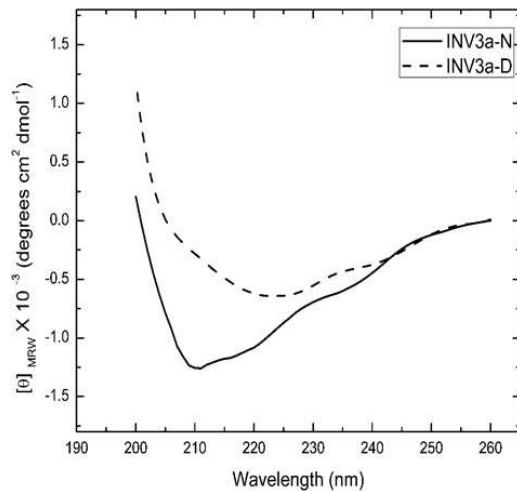


Figura 3. Espectros de CD del UV-lejano (200 a 260 nm) obtenidos con celda de 0.2 cm de longitud. Cada espectro presentado es un promedio de 5 lecturas. Los datos fueron graficados como elipticidad $[\theta]_{MRW}$ contra longitud de onda.

Secuenciación parcial de la invertasa de INV3a purificada.

Los fragmentos peptídicos secuenciados se presentan en la tabla 2. El análisis de similitud de los fragmentos peptídicos mostró que la invertasa INV3a presenta un 99.99% de identidad con la invertasa de *S. cerevisiae* codificada por el gen SUC4 (GenBank No. de acceso 124705).

Tabla 2. Análisis de similitud de la secuencia parcial de aminoácidos de INV3a.

FRAGMENTOS	GEN	FUENTE	PROTEINA	IDENTIDAD
VFWYEPSQKWIMTAAK	SUC4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	93%
IEIYSSDDLK	SUC4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
KFSLNTEYQANPETELINLK	SUC4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
GLEDPPEEYLR	SUC4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
ENPYFTNRMSSVNNQPFKSEN DLSYYK	SUC4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%
	SUC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	100%

Fuente: www.expasy.ch

En la tabla se muestra un análisis de la similitud de cada fragmento peptídico secuenciado de INV3a. *Obtención de la secuencia del gen que codifica para la invertasa INV3a*

Como se puede observar en la figura 4, empleando los oligonucleótidos D31/R31, se observa un amplificado de aproximadamente 400 pb, lo que concuerda con el producto esperado. De la misma manera, empleando los oligonucleótidos D31/R32 se observa una banda de un tamaño aproximado de 800 pb, lo que concuerda con el tamaño esperado, que era de 825 pb. A partir del análisis las secuencias de ambos amplificados se obtuvo una secuencia consenso de 745 bases, lo que corresponde aproximadamente al 50% del gen de interés.

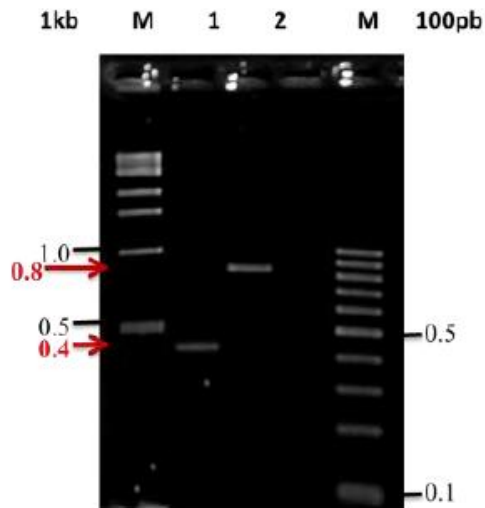


Figura 4. Análisis electroforético de productos de PCR, a partir de DNA genómico de *C.guilliermondii* MpIIIa y los oligonucleótidos D31, D32, R31 y R32. Carril 1, marcadores de tamaño molecular "1 kb DNA ladder"; carril 2 producto de PCR empleando los oligonucleótidos D31/R31; carril 3, producto de PCR empleando los oligonucleótidos D31/R32; carril 4, producto de PCR empleando los oligonucleótidos D32/R32; carril 5, marcadores de tamaño molecular "100 bp DNA ladder".

A partir de esta secuencia parcial, se decidió completar la secuencia del gen mediante el empleo del kit "Genome Walker" para conocer las secuencias adyacentes en dirección 5' y 3'. A partir de las secuencias obtenidas por la técnica de Genome Walker, se logró completar el extremo 5' del gen *inv3a*, incluyendo secuencias nucleotídicas de la región del promotor. Para el extremo 3', se avanzó aproximadamente 400 pares de bases. La secuencia completa obtenida se muestra en la figura 5, así como la secuencia deducida de aminoácidos. La posible caja TATA (TATAAAA) se encuentra a -42 pares de bases río arriba del inicio de la traducción y la posible secuencia de Kozak (GXXATGa) se encuentra en la posición -3. El análisis por similitud de la secuencia deducida de aminoácidos del gen *inv3a* con las secuencias de invertasas reportadas en la literatura, permitió identificar los aminoácidos que participan en el sitio activo de la enzima (D34, D163 y E214), tres dominios de unión a sustrato y 10 sitios potenciales de N-glicosilación. También fue posible identificar la huella de la familia 32 de las glicosil hidrolasas (AFTPSHGWMNDPNG), y un péptido señal de 18 aminoácidos con sitio de corte entre S18 y S19.

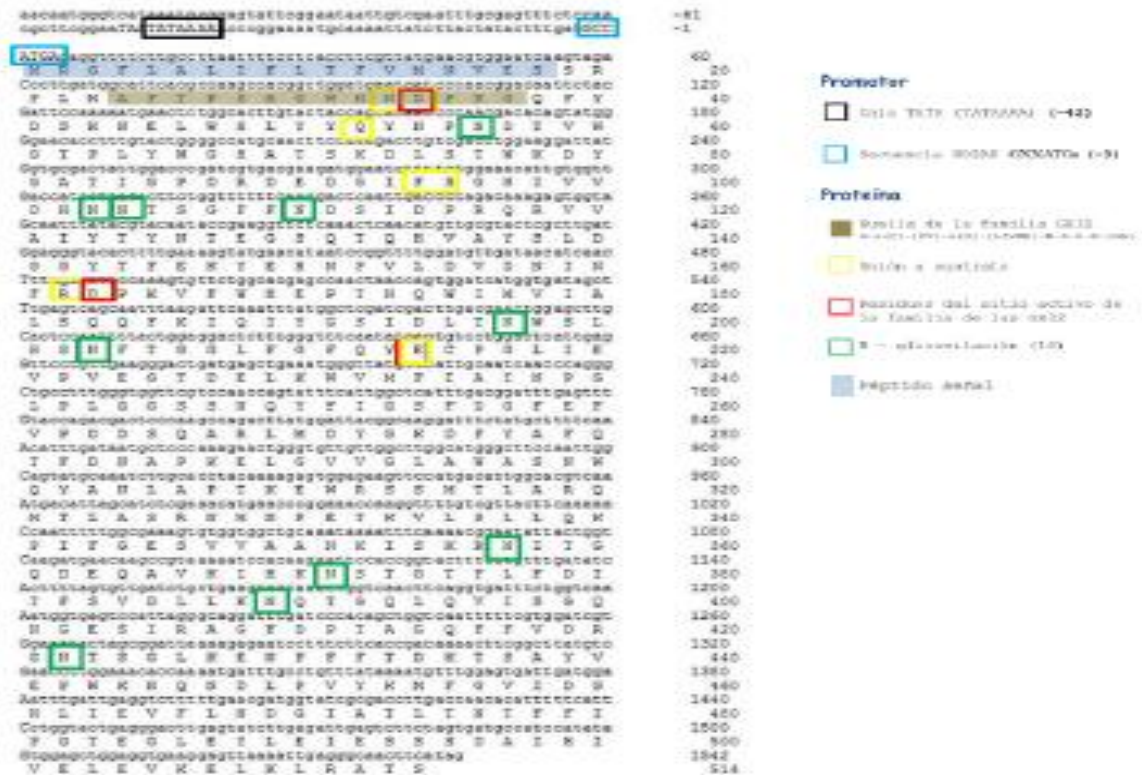


Figura 5. Marco de lectura del gen *inv3a* y secuencia deducida de aminoácidos.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>

<http://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/GLYCOSITE/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?db=pubmed&term=14747991>

<http://prosite.expasy.org/PDOC00532>

Posteriormente se realizó un análisis de similitud de la secuencia del gen *inv3a* con secuencias reportadas en bases de datos. Los resultados de similitud se presentan en la tabla 3. Puede apreciarse que *inv3a* muestra la mayor identidad con la inulinasa de *M. guilliermondii* (99%) y en menor proporción con las invertasas de *S. occidentalis* (57%), *Meyerozyma farinosa* (55%), *Debaryomyces hansenii* (53%), *Yarrowia lipolytica* (48%) y *S. cerevisiae* (49%).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident
NP_021483048.1	hypothetical protein PGUC_02777 (Meyerozyma guillemondi ATCC 1	1081	1081	100%	0.0	99%
AB023756.2	extracellular inulinase (Meyerozyma guillemondi)	1062	1040	100%	0.0	98%
3072.2	Chain A, Structure Of Invertase From Schwanniomyces Occidentalis :	261	261	90%	0.0	87%
3021.2	Chain A, Structure Of Fructofuranosidase From Schwanniomyces Occi	261	261	90%	0.0	87%
A0834605.1	fructofuranosidase (Schwanniomyces occidentalis)	261	261	90%	0.0	87%
3073.2	Chain A, Structure Of E230a-Fructofuranosidase From Schwanniomy	261	260	90%	0.0	87%
3074.2	Chain A, Structure Of D50a-Fructofuranosidase From Schwanniomy	260	260	90%	0.0	87%

Tabla 3. Análisis de similitud de la secuencia de *inv3a* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Predicción de la estructura terciaria de INV3a mediante el empleo de la plataforma I-TASSER

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el empleo de la plataforma ITASSER, la estructura tridimensional de INV3a (Fig 6), generada a partir de la secuencia deducida de aminoácidos obtenida a partir del ORF del gen *inv3a*, corresponde a una invertasa (EC 3.2.1.26). Puede apreciarse también que INV3a mostró similitud con las estructuras reportadas para dos exoinulinasas y las invertasas de *A. thaliana* y de *T maritima*, todas ellas, incluidas en la familia 32 de las glicosil hidrolasas (tabla 4).

Tabla 4. Predicción de la nomenclatura enzimática (EC) de INV3a.

Clasificación	Organismo	EC	Enzima	TM-score
1	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	3.2.1.26	Invertasa	0.98
2	<i>Aspergillus awamori</i>	3.2.1.80	Exo-inulinasa	0.91
3	<i>Cichorium intybus</i>	3.2.1.80	Exo-inulinasa	0.85
4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.2.1.26	Invertasa	0.85
5	<i>Thermotoga maritima</i>	3.2.1.26	Invertasa	0.79

En lo que respecta a homología estructural, INV3a mostró mayor similitud a la invertasa de *S. occidentalis*, con un valor de "TM-score" de 0.983, por lo que la plataforma I-TASSER empleó la estructura de esta invertasa para realizar el modelado de la estructura tridimensional de INV (Fig. 6). De acuerdo a los resultados obtenidos, el modelo presentado en la figura , tiene una precisión estimada de 0.92 (± 0.06) ("TM-score"), con un valor de confianza ("C-score") de 1.46. El modelo de la estructura tridimensional de INV3a presenta un alto contenido de estructura lámina beta, lo cual está en concordancia con los datos obtenidos mediante CD. También resulta interesante comentar, que en el modelo 3D de INV3a, los 10 posibles sitios de N-glicosilación se localizan en la superficie de la enzima, por lo cual es probable que todos ellos puedan ser glicosilados en el paso de la enzima por retículo endoplasmico y Aparato de Golgi.

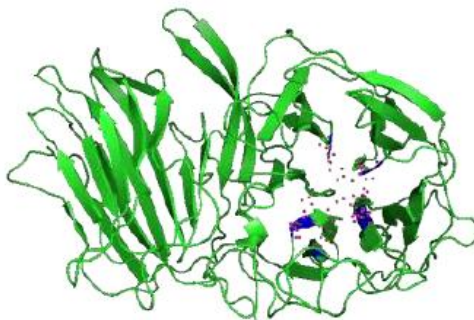


Figura 6. Estructura de la invertasa INV3a determinada mediante la plataforma I-TASSEER.
<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>

CONCLUSIONES

Se obtuvo la secuencia completa del gen *inv3a* de la levadura *Candida guilliermondii* MplIIa. El gen *inv3a* presenta un ORF de 1545 nucleótidos, que codifican para un polipéptido de 514 aminoácidos con un PM teórico de 58 kDa.

La secuencia deducida de aminoácidos del gen *inv3a* presenta un alto % de identidad con la invertasa de *S. occidentalis*; así como también, la huella de la familia de las glicosil hidrolasas GH32, que agrupa a la mayoría de las invertasas.

El producto predicho del gen *inv3a* presenta un péptido señal de 18 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal, el cual muy probablemente le permite ubicarse en el periplasma de la célula, debido a que no se detecta actividad extracelular de invertasa en *C. guilliermondii* MplIIa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, N.; Beldarrain A., Rodríguez L. y Alonso Y. (2000). Characterization of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeasts. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32, 179-187.
2. Álvaro-Benito, M., Polo A., Gonzalez B., Fernandez-Lobato M. y Sanz-Aparicio J. (2010). Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding. *J. Biol. Chem.* 285:13930-13941.
3. Belcarz, A., Ginalska G. y Lobarzewski J. (2002). Immobilized, thermostable S- and F-forms of the extracellular invertase from *Candida utilis* can hydrolyse sucrose up to
4. 100 degrees C. *Biotechnol.Lett.* 24:1993-1998.
5. Casarrubias-Segura, E. (2003). Optimización de la producción, aplicación de células productoras de invertasa. Tesis de Maestría. CICATA – IPN Unidad Puebla.
6. Chaplin, M. y Bucke C. (1990). *Enzyme Technology*. Cambridge: Cambridge University Press; p. 264.
7. Farci, D., Collu, G., Kirkpatrick, J., Esposito, F., & Piano, D. (2016). RhV11 is a membrane-anchored vacuolar invertase highly expressed in *Rosa hybrida* L. petals. *Journal of Experimental Botany*, 67(11), 3303–3312. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw148>.
8. Espinosa-Enríquez, J. (2008). Estabilización y formulación de invertasa para su aplicación en alimentos. Tesis de Maestría. CIBA IPN, Tlaxcala. Lardizabal, Tlaxcala.
9. Ghasemi, Y., Mohkam, M., Ghasemian, A., & Rasoul-Amini, S. (2014). Experimental design of medium optimization for invertase production by *Pichia* sp. *Journal of Food Science and Technology*, 51(2), 267–275. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0494-x>.
10. Gracida-Rodríguez, J., Favela-Torres E., Prado-Barragan A., Huerta-Ochoa S. y Saucedo-Castañeda G. (2002). Invertases. In: Pandey A. (ed) *Enzyme Technology*. New York: Springer. p 449-462.
11. Grafin, D. (1990). One dimensional gel electrophoresis. EN: *Methods in enzymology*, vol. 182. Guide to protein purification, (M. Deutscher), pp. 432, Academic Press.

12. Halász, A. y Lásztity R. (1991). Use of yeast biomass in food production. CRC Press. EUA. Pp. 11.
13. Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V., & Sharma, K. (2013). Invertase and its applications- A brief review. JOPR: Journal of Pharmacy Research, 7(9), 792–797. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.07.014>.
14. Moreno, S., Sánchez Y. y Rodríguez L. (1990). Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe* - a comparative analysis with the invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 142:370-374.
15. Mullan, P., Szakacs-Dobozi M. y Eveleigh D. (1991). Identification of saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4. Biotechnol. Lett. 13(2):137-142.
16. Oda, Y. y Tonomura K. (1994). Characterization of an invertase from *Torulaspota pretoriensis* YK-1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58(6):1155-1157.
17. Pek, H. Bin, Klement, M., Ang, K. S., Chung, B. K. S., Ow, D. S. W., & Lee, D. Y. (2015). Exploring codon context bias for synthetic gene design of a thermostable invertase in *Escherichia coli*. Enzyme and Microbial Technology, 75–76, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.04.008>.
18. Provencher, S. y Gloeckner J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. Biochemistry 20:33-37.
19. Roy, A., Yang J. y Zhang Y. (2012) COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. Nucleic Acids Research, vol 40, W471-W477.
20. Roy, A., Kucukural A. y Zhang Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocols, vol 5, 725-738.
21. Rubio, M., Runco R. y Navarro A. (2002). Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry 61:605-609.
22. Rubio, M. y Maldonado M. (1995). Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. Curr. Microbiol. 31:80-83.
23. Schomburg, I., Chang A., Placzek S., Söhngen C., Rother M., Lang M., Munaretto C., Ulas S., Stelzer M., Grote A., Scheer M. y Schomburg D. (2013). BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. Nucl. Acids Res. 41(1)764-772.
24. Segrest, J. y Jackson R. (1972). Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. In Methods in enzymology (Ginsburg V.), Academic Pres. New York. Vol. 28 pp 54-63.
25. Williams, R., Trumbly R., MacColl R., Trimble R. y Maley F. (1985). Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast SUC2 gene. J. Biol. Chem. 260:13334-13341.
26. Workman, W. y Day D. (1983). Purification and properties of the betafructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. FEBS Lett. 160:16-20.
27. van Stokkum, I., Spoelder H., Bloemendal M., van Grondelle R. y Groen F. (1990). Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. Anal. Biochem. 191:110-118.
28. Veana, F., Aguilar, C. N., Viader-Salvadó, J. M., & Rodríguez-Herrera, R. (2011). Invertasa del Género *Aspergillus* y su Impacto Biotecnológico. Biotecnología., 15(1), 11–29.
29. Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics, 9:40.

COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA SEMILLA DE CHÍA (*SALVIA HISPÁNICA L.*) OBTENIDOS CON DIFERENTES SOLUCIONES ETANÓLICAS

Gema Morales Olán, Marlon Rojas López, Paola Mateo Roque, Silvia Luna Suárez

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, CIBA-IPN, Tepetitla, Tlaxcala, CP. 90700, México.

RESUMEN

En los últimos años el consumo de la semilla de chía (*Salvia hispánica L.*) se ha incrementado debido a la calidad nutrimental que posee, ya que contiene cantidades elevadas de proteínas, ácidos grasos, así como compuestos fenólicos con potencial actividad antioxidante. Los antioxidantes naturales tienen gran demanda en la industria de los alimentos y en el área de la salud debido a sus múltiples beneficios. Sin embargo, el empleo de algunos disolventes para la extracción de compuestos antioxidantes en especies vegetales limita el uso de los extractos, debido a que pueden quedar trazas de este, ocasionando efectos nocivos sobre la salud. Razón por la cual, se hace necesario investigar la eficiencia de disolventes de baja toxicidad para el aislamiento de estas moléculas. En este trabajo se presenta la evaluación de la efectividad de soluciones etanólicas en la extracción de compuestos fenólicos de la chía. La harina de chía se mezcló con soluciones etanólicas a diferentes concentraciones (**100%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50%**) y se cuantificaron los compuestos fenólicos mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados demuestran que la cantidad de compuestos fenólicos extraídos en la chía fueron superiores a lo reportado en la literatura, obteniendo valores desde **2.1** hasta **2.8 mg EAG/g de chía**, cuantificando la mayor cantidad en el extracto etanólico al **50%**, por lo que es posible utilizar soluciones etanólicas como una alternativa económica, de baja toxicidad y reutilizable en la extracción de compuestos fenólicos en la chía.

INTRODUCCIÓN

La *Salvia hispánica L.* es una planta originaria de México y Guatemala (Mohd *et al.*, 2012) nombrada comúnmente como chía. Las semillas de la chía han adquirido gran valor para la sociedad, debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. Como alimento aporta una cantidad significativa de proteínas (**15–25%**), carbohidratos (**26–41%**), ácidos grasos (**30–33%**) y fibra (**36–40%**) (Segura *et al.*, 2014; Suri *et al.*, 2016). En medicina se ha reportado su uso como supresor del apetito, coadyuvante para la pérdida de peso, regulador de la función intestinal y de la glucosa en sangre (Sandoval y Paredes, 2012). Por otra parte, se describió que la semilla de esta planta también protege contra enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cáncer, Alzheimer y Parkinson (Corona *et al.*, 2016), debido a que es fuente de antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol (Reyes *et al.*, 2008, Capitani *et al.*, 2012). Muchas investigaciones se han enfocado en metodologías que permitan obtener la mayor cantidad de compuestos fenólicos, siendo la extracción con disolventes, la más utilizada (Oroian y Escriche, 2015). No obstante, el tipo de disolvente (metanol, éter, hexano, acetatos, entre otros) delimita la aplicación del extracto, ya que existen restricciones por toxicidad que varían de acuerdo con diferentes legislaciones. En la literatura se ha reportado el uso de metanol, como principal medio de extracción de los compuestos fenólicos en la harina de la chía. Silveira y Salas (2014) utilizando **100%** metanol, obtuvieron **0.64 mg EAG/g de chía** y Martínez y Paredes (2014) cuantificaron una cantidad mayor, **1.63 mg EAG/g de chía** con metanol al **70%**. Los extractos obtenidos con este disolvente deben asegurar que no queden trazas de metanol, ya que tiene efectos toxicológicos provocando irritabilidad, náuseas, vómito, visión borrosa y hasta la muerte (Villanueva *et al.*, 2002). En este trabajo se presentan los resultados de evaluar la eficiencia de soluciones etanólicas a diferentes concentraciones (**100%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50%**) en la extracción de compuestos fenólicos de la chía, como una alternativa económica, sencilla, reutilizable y menos tóxica.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos

Las semillas de chía fueron obtenidas en el estado de Puebla, México. Se limpiaron manualmente y fueron pasadas por un tamiz malla número **20** (Mont-Inox, México D.F.), para eliminar materia

extraña como piedras y tierra. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. El reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido gálico fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Sigma Co., San Luis, E.U).

Obtención de la harina

La harina se generó por molienda de las semillas en un procesador de alimentos (GX4100, Krups, E.U.) y pasándolas por un tamiz malla número 20 (Mont-Inox, México D.F.) para obtener un tamaño de partícula homogénea.

Extracción de los compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando la metodología propuesta por Martínez y Paredes (2014). La harina de chía se mezcló con diferentes soluciones etanólicas (100%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50%) y metanólica al 70%. Las muestras se mantuvieron en agitación mediante un agitador de rodillo (Stuart SRT6, Cole-Parmer, Reino Unido) durante 24 h y fueron centrifugadas a 6,000 rpm (Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Alemania) por 10 min. El sobrenadante fue almacenado a 10 °C hasta su análisis.

Cuantificación de los compuestos fenólicos

Fue realizada mediante el método de Folin-Ciocalteu (Swain y Hillis, 1959). La absorbancia se midió a 760 nm en un lector de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., E.U) con un software de análisis de datos Gen5™ 2.0. El ácido gálico fue utilizado en la curva de calibración (0 – 100 µg/mL) y los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g de chía). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

En la Figura 1 se presentan los mg EAG/g de chía cuantificados mediante la curva de calibración con ácido gálico (0 – 100 µg/mL, $y = 0.0017x + 0.0519$, $R^2 = 0.99$) en las diferentes soluciones etanólicas.

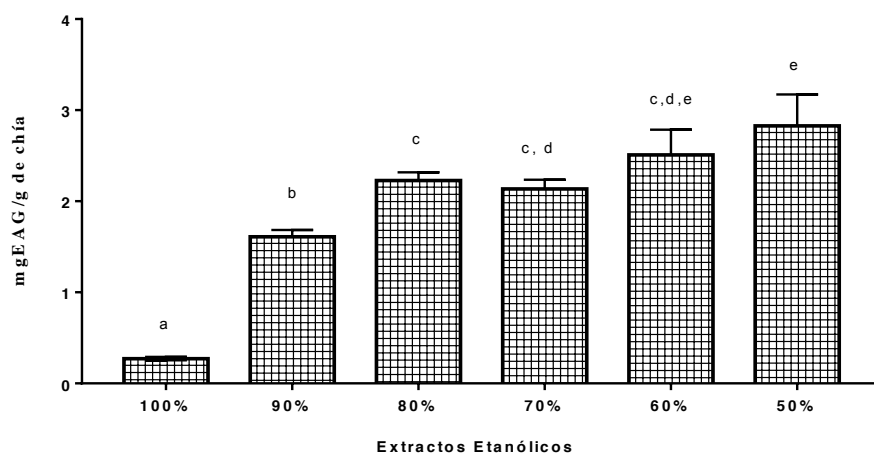


Figura 1. Contenido de compuestos fenólicos determinado en los extractos etanólicos de la harina de chía. Los resultados muestran la media de 3 réplicas ± SD. Las columnas con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

Se observa que a excepción del extracto con etanol al 100%, la cantidad de compuestos fenólicos obtenidos en la chía fue superior a lo reportado en la literatura. Incluso al evaluar las condiciones propuestas por Martínez y Paredes (2014), en el extracto derivado de metanol al 70% se cuantificó un valor superior 1.90 ± 0.21 mg EAG/g de chía. La mayor cantidad de fenoles se obtuvo con etanol al 50% (2.82 ± 0.32 mg EAG/g de chía), seguido por el extracto etanólico al 60% (2.50 ± 0.32 mg EAG/g de chía) y 80% (2.22 ± 0.09 mg EAG/g de chía). Al evaluar estadísticamente los resultados se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Por otro lado, la cantidad de compuestos fenólicos cuantificados en la chía es superior a lo reportado en algunas especies vegetales importantes en la alimentación como el salvado de avena (*Avena sativa*)

0.4 mg EAG/g, trigo (*Triticum aestivum*) **1.0 mg EAG/g**, zanahoria (*Daucus carota*) **0.6 mg EAG/g**, cebolla (*Allium cepa*) **2.5 mg EAG/g**, entre otras (Kähkönen *et al.*, 1999) y similar a especies consideradas antioxidantes, como el brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*) cuya cantidad de fenoles es de **1.0 mg EAG/g** (Chu *et al.*, 2002) y la fresa (*Fragaria vesca*) con **1.6 – 2.9 mg EAG/g** (Heinonen *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

Los compuestos fenólicos cuantificados en los extractos etanólicos fue de **2.1 – 2.8 mg EAG/g de chía**. La mayor cantidad de fenoles se obtuvo con la solución etanólica al **50%**. Los resultados demuestran que es posible utilizar soluciones etanólicas como una alternativa económica, no tóxica y reutilizable en la extracción de compuestos fenólicos en la chía.

REFERENCIAS

1. Mohd Ali, N.; Yeap, K.; Ho, Y.; *et al.* "The promising future of chia, *Salvia hispanica* L.", BioMed Research International., 2012, pp.1-7.
2. Segura, R., Ciau, N., Rosado, G., Chel, L., Betancur, D. "Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México". Agricultural Sciences, Vol. 5, 3, 2014, p. 220.
3. Suri, S.; Passi, J.; Goyat, J. "Chia Seed (*Salvia Hispanica* L.)—A New Age Functional Food". In 4th International Conference on Recent Innovations in Science Engineering and Management. 2016, pp.752-760.
4. Sandoval, R.; Paredes, O. "Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.)". Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 61, 1, 2012, pp.193-201.
5. Corona, E., Martínez, N., Ruíz, H., Carranza, J. "Ultrasound-assisted extraction of phenolics compounds from chia (*salvia hispanica* l.) seeds and their antioxidant activity". Agrociencia. Vol 50, 2016, pp. 403-412.
6. Reyes, E.; Tecante, A.; Valdivia M. "Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds". Food Chemistry. Vol.107, 2008, pp. 656-58.
7. Capitani, M. I.; Spotorno, V.; Nolasco, S. M.; Tomás, M. C. "Physicochemical and functional characterization of by products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina". LWT - Food Science and Technology. Vol. 45, 2012, pp. 94-102.
8. Oroian, M.; Escriche R., "Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis". Food Research International. Vol. 74,2015, 10-36.
9. Silveira, M.; Salas M. "Chemical Characterization of chia (*Salvia hispánica* L.) for Use in Food Products". Journal of Food and Nutrition Research. Vol. 2, 5, 2014, pp. 263-265.
10. Martínez, O.; Paredes, O. "Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra-high-performance liquid chromatography". Journal of Chromatography A. Vol.1346, 2014, pp. 43-48.
11. Villanueva, A.; Ferrer, D.; Civeira, E.; Gutiérrez, I.; Laguna M.; Cerrada E. "Intoxicación por metanol". Medicina Intensiva. Vol. 26, 2002, pp. 264-266.
12. Swain, T.; Hillis. W. "The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents". Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol.10, 1, 1959, pp.63-68.
13. Kähkönen, M. P., Hopia, A. L., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds". Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 47, 1999, pp. 3954-3962.
14. Chu, Y., Sun, J., Wu, X., Liu, R. "Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables". Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 50, 23, 2002, pp. 6910-9616.
15. Heinonen, I. M.; Meyer, A. S.; Frankel, E. N. "Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation". J. Agric. Food Chem. Vol. 46, 1998, pp. 4107-4112.

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE NECTAR DE YACA TERMOULTRASONICADO COMPARADO CON LA PASTEURIZACIÓN

Nelly del Socorro Cruz Cansino, Ernesto Alanís García, José Alberto Ariza Ortega, Esther Ramírez Moreno, Zuli Calderón Ramos, José de Jesús Manríquez Torres

Centro de Investigación Interdisciplinario. Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

RESUMEN

La yaca es una fruta tropical con bombillas y de textura suave, de la familia de las Moráceas. Se cultiva en países de clima tropical (India, China, Asia, África y América Latina). La pasteurización es eficiente en la prevención del deterioro microbiano para conservar jugos y néctares; sin embargo, la temperatura elevada causa cambios que afectan la calidad del producto (pérdidas de compuestos fenólicos y volátiles), ocasionando cambios en sabor, por esto es importante utilizar tecnologías emergentes como el termoultrasonido combinado con temperaturas controladas, para evitar daños en los productos. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del termoultrasonido sobre las propiedades antioxidantes comparado con un pasteurizado. El néctar se sometió a ultrasonido (SONIC VCX-1500) en condiciones de 50 ± 1 °C y 15 ± 1 min, se evaluó contenido de fenoles, ácido ascórbico, actividad antioxidante por ABTS y DPPH. La muestra control mostró valores altos de ácido ascórbico seguido del termoultrasonido (225 mg y 106 EAA/L, respectivamente), el pasteurizado tuvo valores de 52 mg EAA/L, mientras que en fenoles el néctar termoultrasonido presentó altos valores ($p < 0.05$) con 132 mg EAG/L respecto al pasteurizado (86 mg EAG/L) y control (31 mg EAG/L). Los resultados de actividad antioxidante por ABTS y DPPH mostraron que el néctar termoultrasonido arrojó alta propiedad antioxidante (4203 $\mu\text{mol ET/L}$ y 84 $\mu\text{mol ET/L}$, respectivamente), la muestra control tuvo valores de 3081 $\mu\text{mol ET/L}$ y 41 $\mu\text{mol ET/L}$, la pasteurizada 2248 $\mu\text{mol ET/L}$ y 22 $\mu\text{mol ET/L}$, respectivamente. El termoultrasonido podría ser una buena alternativa como proceso tecnológico para la elaboración de néctar de yaca.

INTRODUCCIÓN

Los frutos son usualmente consumidos de forma natural, en jugos o en néctares. La elaboración de un néctar, requiere de un tratamiento para su conservación y la inactivación de microorganismos, el cual a su vez no ocasione daños físicoquímicos al producto, con la finalidad de que siga teniendo las mismas propiedades que tiene el fruto. La pasteurización es un proceso de conservación de alimentos muy utilizado por industrias, por ser eficiente en la prevención microbiana y ser de bajo costo, pero provoca cambios físicoquímicos al igual que ocasiona pérdidas de nutrimentos y compuestos fitoquímicos, fenólicos y volátiles. Es por ello que actualmente se está innovando la aplicación de tecnologías emergentes con la finalidad de obtener un mejor producto como es el caso de la termoultrasonificación que no causen los daños anteriormente mencionados. La yaca (*Artocarpus heterophyllus*) es una fruta tropical con bombillas y de textura suave, perteneciente de la familia de las Moráceas. En México, se produce en los estados de Quintana Roo, Colima, Michoacán, Veracruz y Yucatán, siendo este es el principal estado productor de yaca con 7,452.27 toneladas, donde el municipio de San Blas el mayor productor. El consumo de la yaca es preferentemente en fresco, aunque también se elaboran helados, panes, mermeladas y aguas frescas. Con la finalidad de promocionar el consumo de este fruto, se obtuvo un néctar tratado por termoultrasonido como una alternativa a la pasteurización, con las mismas características nutritivas y capacidad antioxidante que contiene el fruto. Se evaluaron las propiedades antioxidantes de ácido ascórbico, contenido de fenoles así como actividad antioxidante (ABTS, DPPH y quelante).

TEORÍA

Yaca

La yaca (*Artocarpus heterophyllus*) es una fruta tropical con bombillas y de textura suave, perteneciente de la familia de las Moráceas. Se cultiva ampliamente en países de clima tropicales, incluyendo el subcontinente Indio, el sur de China, los países del sureste de Asia, África y los países de América Latina (Samaddar, 1985). El fruto se divide principalmente en tres partes, el eje de la fruta, el perianto persistente y el verdadero fruto. El perianto se compone de tres regiones comestibles;

el bulbo, la región fusionada media y el superior libre. El peso del fruto oscila entre 2 y 3 Kg, de los cuales la proporción es 59% de pulpa, 37% de cáscara y 4 % de semilla. La yaca madura es de color amarillo y aromatizado y dentro contiene semilla, cada fruto es cilíndrico de forma ovoide y tienen una longitud de 30-40 cm (Piña, 2010). La yaca crece naturalmente en los bosques húmedos tropicales y subtropicales, por encima de los 1.300 m de altura (Khan, 2004); aunque la calidad de los frutos, especialmente maduros, es superior en elevaciones hasta los 200 m.s.n.m. (Crane et al., 2000).

Producción de la yaca

Es originaria de la India y Oceanía y se cultiva en varios países tropicales como Bangladesh, Malasia, Indonesia, Filipinas, Puerto Rico, Brasil (Baliga, 2011). En México, se produce en los estados de Quintana Roo, Colima, Michoacán, Veracruz y Nayarit, siendo este es el principal estado productor de yaca con 7,452.27 toneladas, siendo el municipio de San Blas el de mayor producción. El consumo es preferentemente en fresco, aunque también se elaboran dulces y panes regionales (Helados, aguas frescas, panes y mermeladas) y con frecuencia las semillas hervidas son consumidas como una botana (SIAP, 2011). Aunque no ha sido del todo conocida, ni explotada industrialmente, como en Australia, Malasia, Jamaica, donde la pulpa se procesa, se deshidrata y se vende como pulpa seca, jugo, galletas, salsa picante, mermelada, jalea, caramelo, y pastas (Elevitch et al., 2006).

Composición de la pulpa de yaca

En 100 g de porción comestible, la yaca contiene 18.9 g de hidratos de carbono, 1.9 g de proteína, 0.1 g de grasa 77% de humedad, 1.1 g de fibra, 20 mg de calcio, 30 mg de fósforo, 500 mg de hierro, 540 UI de vitamina A, 30gr de tiamina, y un valor calórico total de 84 calorías (Bose, 1985). La pulpa es rica en vitaminas A, B, C, y minerales como el calcio y el hierro (Crane et al., 2005), también es una fuente de energía y se ha reportado que tiene efectos laxantes como resultado de su contenido de fibra dietética (Morton, 1987). Además de la fructosa, glucosa y sacarosa también contiene ácidos grasos como son capríco, mirístico, láurico, palmítico, oleico, esteárico, linoleico y ácido araquidónico en las diferentes partes de la yaca (Chowdhury et al, 1997). Sin embargo el contenido de nutrientes se ve afectado por la madurez del fruto, es decir que la fruta madura presenta una mayor cantidad de nutrientes comparada con la fruta no madura (Haq, 2006).

Efectos biofuncionales

Se ha demostrado que el fruto de la yaca presenta una importante actividad antioxidante, esto es debido a su alto contenido de ácido ascórbico y vitamina A. Estudios realizados han demostrado que la yaca decrece el daño oxidativo principalmente de los lípidos (Ko et al., 1998). En animales evidencian que el tallo de la fruta posee efectos antiinflamatorios y presenta propiedades anticancerígenas (Chanda et al., 2009). La yaca es eficaz en la inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios a partir de mastocitos, neutrófilos y macrófagos (Wei et al., 2005). Los estudios experimentales indican que la yaca tiene usos medicinales incluyendo antioxidantes, antiinflamatorio, antimicrobiano, anticáncer, antifúngicos, antineoplásicos y efectos hipoglucémico, e inhibe la cicatrización de la biosíntesis de melanina. Las propiedades farmacológicas observadas pueden ser atribuidas a la presencia de varios fitoquímicos. La yaca contiene muchas clases de compuestos fenólicos como carotenoides, flavonoides, ácidos volátiles y esteroides de concentración de acuerdo a su variedad, y que se encuentran principalmente en la pulpa y semilla (Baliga, 2011). El consumidor valora aquellos alimentos que no sólo le proporcionen nutrientes indispensables para la vida (hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, etc.), sino aquellos que poseen sustancias con un posible efecto protector como compuestos fitoquímicos o bioactivos (antioxidantes, vitaminas, flavonoides, glucosinolatos, compuestos organosulfurados, lactonas sesquiterpénicas, etc.) (Prior et al., 2000). Así como también busca alimentos libres de microorganismos, que no causen daños a la salud, y que sean duraderos, es por ello que las industrias utilizan métodos para eliminar microorganismos y aumentar la vida de anaquel de los alimentos, como es el caso de la pasteurización.

Pasteurización de jugos

La pasteurización es un tratamiento térmico en el cual el alimento se somete a temperaturas inferiores a 100 °C. En alimentos con una acidez baja (pH >4.5) se utiliza para minimizar el posible riesgo para la salud, que podrían ocasionar microorganismos patógenos presentes en los alimentos, así como, para prolongar su vida útil durante varios días, en alimentos ácidos (pH <4.5), se utiliza

para prolongar su vida útil durante meses (Fellows, 2000). En ambos tipos de alimentos provoca cambios que afectan la calidad del producto, produce pérdidas significativas de compuestos fenólicos y volátiles, ocasionando cambios en el valor nutritivo y características organolépticas del alimento (Jeyamkondan, 1999). En un estudio sobre frutas cítricas (naranja, pomelo, mandarina, limón y lima Rangpur) tratados por pasteurización, se observó una degradación de la actividad antioxidante hidrosoluble (Acevedo et al., 2004). También durante el proceso de conservación de los productos elaborados se causa una pérdida inevitable de nutrientes y del sabor, es por ello que se deben emplear tratamientos alternativos (Téllez, 2001), como pueden ser altas presiones hidrostáticas (Harte, 2003), pulsos eléctricos (Bendicho et al., 2005), radiaciones ionizantes (Guerrero, 2006), ultrasonidos (Barbosa, 2002) entre otros.

Ultrasonido

El ultrasonido consiste en la producción de ondas sonoras de frecuencia elevada, se basa en el fenómeno de cavitación, lo cual consiste en la generación, crecimiento y colapso de microburbujas, las cuales tienen la capacidad de romper las partículas permitiendo una liberación de los compuestos, y se utiliza para inactivación de microorganismos generándonos un producto libre de ellos. Algunos de los usos del ultrasonido son: limpieza y desinfección, mezclado y emulsificación, impregnación, filtración, cristalización y precipitación, congelación, deshidratación, conservación, (Ashokkumar et al., 2008), esta tecnología comparada con otras nuevas técnicas es preferida por ser segura, no tóxica, amigable ambientalmente, benigno para el público en general (Seçkin et al., 2012) y por no alterar propiedades nutricionales y organolépticas de alimentos cuando se emplea en la industria alimentaria (Azuola et al., 2007). Algunos ejemplos del uso de ultrasonido es el jugo de manzana en el cual se utilizó para inactivar *Alicyclobacillus acidiphilus* y *Alicyclobacillus acidoterrestris*, dando resultados favorable (Wang, 2010). En el jugo de tomate se empleó para la inactivación de levaduras, y ocasionó buenos resultados (Adekunte, 2009). Y en el jugo de naranja se observaron cambios en la carga microbiana, se aumentó el color, la calidad sensorial y nutricia del producto (Valero, 2006). Se ha encontrado que el ultrasonido es más eficaz cuando se combina con otros métodos antimicrobianos, como es la ozonización que es un gas el cual reacciona oxidando al contaminante, la osmosonificación que se basa en concentraciones muy altas de algún soluto con la finalidad de producir plasmólisis a los microorganismos (Sevilla, 2009), y el termoultrasonido que se basa en la aplicación de calor combinado con ultrasonido para así generar una inactivación de microorganismos como *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus spores* (Burgos, 1976; Sanz et al., 1985).

Termoultrasonificación

La termosonificación es el sometimiento de un producto a ultrasonidos y a calor moderado a no más de 50°C, sin embargo la temperatura aumenta respecto al nivel de tratamiento aplicado es por ello que se requiere un control de la temperatura, el ultrasonido de procesamiento por sí solo o en combinación con calor es una herramienta de procesamiento efectiva para la inactivación microbiana y la retención de nutrientes en los alimentos (Zenker et al., 2003). Tiene como finalidad garantizar la seguridad alimentaria ya que una de las ventajas con las que cuenta es utilizar temperaturas más suaves que evitan la degradación de compuestos termosensibles en un tiempo reducido (Piyasena, 2003). La termosonificación es una excelente alternativa al tratamiento térmico ya que se ha comprobado que tiene un efecto mínimo en la calidad de los zumos de frutas como en el jugo de naranja y néctares (Tiwari et al., 2008a).

Néctar

Se entiende por néctar de fruta al producto sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene añadiendo agua con o sin la adición de azúcares, pueden añadirse sustancias aromáticas, componentes aromatizantes volátiles y pulpa, todos los cuales deberán proceder del mismo tipo de fruta y obtenerse por procedimientos físicos, el nivel mínimo de sólidos solubles totales establecidos es de 15 °Brix (CODEX STAN 247-2005), todavía no se ha especificado un nivel de sólidos solubles totales de la yaca como néctar, por lo que se consideraría dentro de otras bebidas debido a su alto contenido de pulpa y su fuerte aroma, como la piña o el mango.

PARTE EXPERIMENTAL

Tratamiento por termoultrasonido

Se utilizó un equipo de ultrasonido modelo (VCX-1500, Sonics Materials, Inc. Newtown, CT, USA) a 1500 W a frecuencia de 20 KHz, con una sonda de 13 mm a una amplitud de 80% 15±1 min con 2 segundos apagados y 4 segundos encendido utilizando un recipiente de doble pared de 400 ml a temperaturas controladas utilizando un baño (COLE-PARMER MODELO 12108-10, USA) con una temperatura de salida de 50±1 °C.

Determinación de fenoles totales

Se determinó de acuerdo al método de Stintzing et al (2005), el cual utilizo el reactivo Folin – Ciocalteu. Este reactivo es una mezcla de ácido fosfotúgstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica que ocurre en condiciones alcalinas. Para esta determinación se utilizaron como reactivos Carbonato de sodio al 7.5 % y Folin–Ciocalteu diluido 1:10. Se agregaron 100 µl de muestra, 500 µl de folin y 400 µl de carbonato de sodio, se agitó en un vortex y se dejó reposar durante 30 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia a 765 nm empleando lector de microplacas (Power Wave XS Bio Tek. Software KC Junior, USA).

Determinación de ácido ascórbico

Para la determinación de ácido ascórbico, se empleó el método colorimétrico de acuerdo a Dürüst, et al., 1997, utilizando el reactivo DCPI (2,6 diclorofenolato sódico), que tiene una coloración azul-violeta y al reaccionar con el ácido ascórbico, ocurre una decoloración a rosa tenue o incoloro. Se prepararon las siguientes soluciones: DCPI, amortiguador de acetatos al 1 M con pH de 6 y solución de ácido ascórbico. Se efectuaron concentraciones a partir de la solución de ácido ascórbico: 0, 10, 20, 30, 40, y 50 mg/L, se tomaron 100 µL de cada concentración para la obtención de la curva estándar (Anexo 3, Figura 24). La técnica para la curva y la muestra de estudio se realizó vertiendo 100 µL de la muestra previamente diluida, 100 µL de amortiguador de acetatos y 800 µL de DCPI, se determinó la absorbancia (Abs) a 520 nm empleando lector de microplacas (Power Wave XS Bio Tek. Software KC Junior, USA).

Determinación de actividad antioxidante por ABTS

La actividad antioxidante en base al catión libre de ABTS^{•+}, se llevó a cabo acuerdo al método descrito por Kuskoski et al (2004). El ABTS^{•+} es un radical con un nitrógeno central que presenta un color característico azul - verde, cuando este catión radical es reducido por un antioxidante a la forma no radical, presenta una pérdida de color. Esta determinación se realizó mediante la formación del radical ABTS, el cual se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM, concentración final), incubados a temperatura ambiente (± 25 °C) y en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS se diluyó hasta obtener valor de absorbancia comprendido entre 0.70 (± 0.1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción) utilizando el espectrofotómetro. Se agregaron 20 µl de néctar y 980 µl de solución de ABTS, se agitó en el vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 7 minutos, posteriormente se determinó la absorbancia a 754 nm empleando lector de microplacas (Power Wave XS [Bio Tek]. Software KC Junior, USA).

Determinación de actividad antioxidante por DPPH

La actividad antioxidante en base al radical DPPH[•] se evaluó de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez - Pérez (2001). El reactivo DPPH[•] es un radical libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, el electrón no apareado del DPPH[•] se aparea e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados. Esta determinación consistió en agregar 100 µl de néctar y 500 µl de solución DPPH, se agito en el vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente por una hora, posteriormente se determinó la absorbancia a 520 nm, empleando lector de microplacas (Power Wave XS [Bio Tek]. Software KC Junior, USA). Los resultados fueron expresados en µmol equivalente de trolox por 100 ml de muestra.

Análisis estadístico

Todas las pruebas serán realizadas por triplicado, los resultados se analizaron realizando un análisis de varianza utilizando el programa SPSS y se expresaron como media ± desviación estándar (SD), se utilizó la prueba de Duncan para obtener las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras

RESULTADOS

Contenido de ácido ascórbico

En el contenido de ácido ascórbico, se puede observar que en las muestras sometidas a tratamientos de termoultrasonido y pasteurizado mostraron una degradación de ácido ascórbico del 50% para el termoultrasonido con respecto al control (Figura 1), y en el pasteurizado una pérdida del 75 %. Presentando valores significativamente mayores de ácido ascórbico en el néctar termoultrasonido (106 ± 10.87 mg EAA/L) con respecto al néctar pasteurizado (52.40 ± 12.36 mg EAA/L). En un estudio sobre los efectos de la pasteurización en jugos de frutas, indica que el contenido de ácido ascórbico puede degradarse fácilmente debido a la temperatura empleada y por los procesos de oxidación (Villareal D. et al., 2013). Por otro lado se ha reportado que durante el tratamiento de ultrasonido se elimina el oxígeno, confiriendo estabilidad al ácido ascórbico al evitar su oxidación incluso durante el almacenamiento (Tiwari et al., 2009).

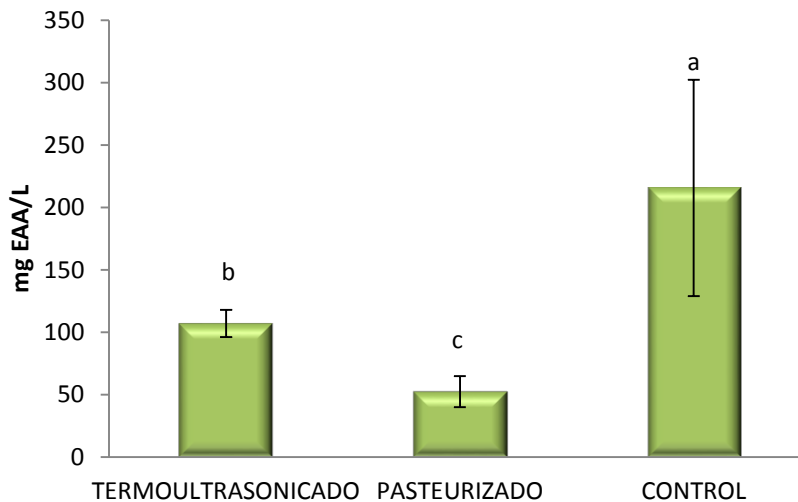


Figura 1. Contenido de ácido ascórbico (mg AA/L) de néctar termoultrasonido, pasteurizado y control. ^{a,b,c}Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Contenido fenólico total

El tratamiento por termoultrasonido tuvo valores más elevados significativamente de contenido de fenoles totales (132.92 ± 26.63 mg EAG/L) en comparación con el pasteurizado (86.45 ± 9.58 mg EAG/L) y el control (31.59 ± 8.02 mg EAG/L) (Figura 2). En otros estudios como en el jugo de uva (Lieu et al., 2010) y jugo de mango (Sathirasegaram et al., 2013), reportaron un mayor contenido fenólico en sus muestras tratadas por termoultrasonido. Según Tiwari et al., 2008, señala que existe una liberación de compuestos fenólicos que se encuentran en la pared celular debido al fenómeno de cavitación durante el ultrasonido.

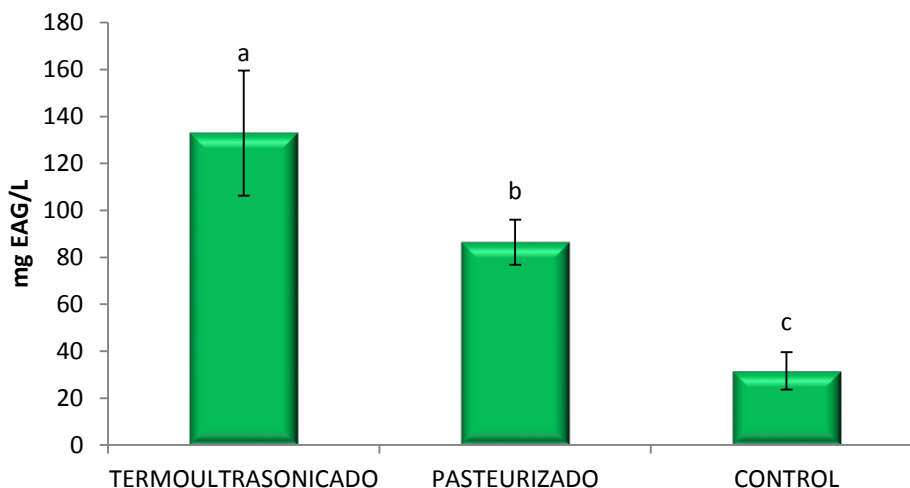


Figura 2. Contenido fenólico total (mg EAG) de néctar termoultrasonificado, pasteurizado y control.
a,b,c Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Actividad antioxidante por ABTS y DPPH

Los resultados de la actividad antioxidante por ABTS y DPPH se muestran en la figura 3. Se observó en actividad antioxidante por ABTS (Figura 3A), que para el néctar tratado por termoultrasonido fueron de $4203.61 \pm 1091.46 \mu\text{mol ET/L}$, significativamente mayor con respecto al control ($3081.85 \pm 413.57 \mu\text{mol ET/L}$) y el pasteurizado de ($2248.98 \pm 346.63 \mu\text{mol ET/L}$). El aumento de la actividad antioxidante medido por ABTS del néctar tratado por termoultrasonido podría asociarse a los efectos que genera la amplitud y el tiempo sometido al ultrasonido (Zafra-Rojas et al., 2013; Cruz Cansino et al., 2015). Por otro lado los resultados en el néctar pasteurizado podrían ser debido al tratamiento térmico empleado (Acevedo et al., 2004). En los resultados de la actividad antioxidante por DPPH (Figura 3B), se observa que la muestra tratada por termoultrasonido presentó valores significativamente mayores de actividad antioxidante con $84.21 \pm 18.57 \mu\text{mol ET/L}$, respecto al control y pasteurizado ($41.99 \pm 8.70 \mu\text{mol ET/L}$; $22.98 \pm 7.99 \mu\text{mol ET/L}$, respectivamente). Los resultados obtenidos de actividad antioxidante en el néctar de yaca tratado por termoultrasonido, pueden ser debido a la liberación de los compuestos fenólicos como resultado de la cavitación que se genera durante el tratamiento, ya que los fenoles son los responsables principalmente del apareamiento del radical DPPH (Aadil et al., 2013)

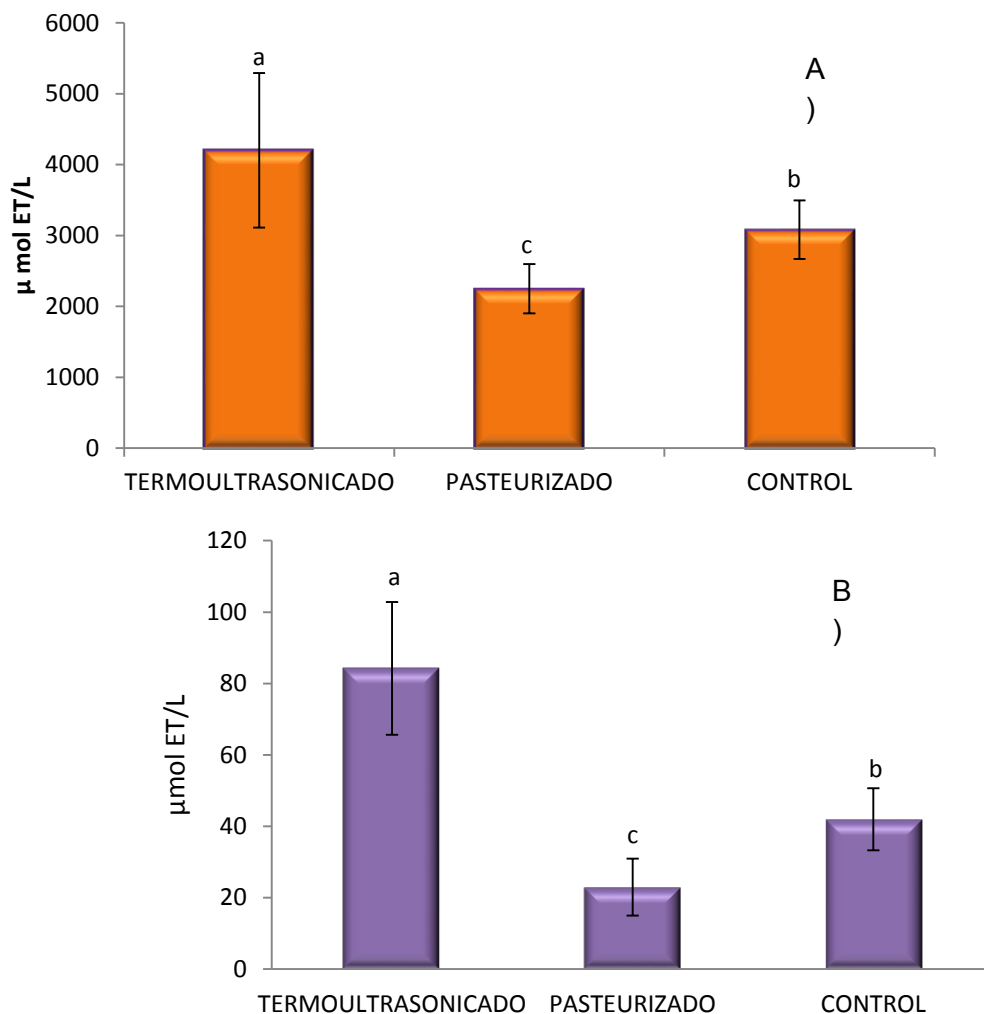


Figura 4. Actividad antioxidante por el método A) ABTS y B) DPPH de néctar termoultrasonicado, pasteurizado y control. ^{a-c}Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

CONCLUSIÓN

El néctar tratado por termoultrasonido presentó una cantidad significativamente mayor de contenido de fenoles, ácido ascórbico, actividad antioxidante medida por ABTS y DPPH comparado con el pasteurizado. El tratamiento de termoultrasonido, demuestra ser una tecnología adecuada para el procesamiento del néctar de yaca con elevada propiedad antioxidante en comparación con la pasteurización.

BIBLIOGRAFÍA

1. H. M. Samaddar "Jackfruit", in *Fruits of India: tropical and subtropical*. Naya Prokash/Culcutta, India, (1985), pp. 638–649.
2. G. Piña, J. Quiroz, A. Ochoa, S. Magaña, "Caracterización físicoquímica de frutas frescas de cultivos no tradicionales en Venezuela i la yaca", *Agron. Trop.*, Vol. 60, 1, 2010, pp. 35-42.
3. M. L. Khan, "Effects of seed mass on seedling success in *Artocarpus heterophyllus* L., a tropical tree species of north-east India", *Acta Oecol.*, Vol. 25, 1-2, 2004, pp. 103-110.

4. J. Crane, C. Balerdi, "La Jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) en Florida." Departamento de Ciencias Hortícolas, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. Disponible en línea: <http://hammock.ifas.ufl.edu>. 2000.
5. M. S. Baliga, A. R. Shivashankara, R. Haniadka, J. Dsouza, H. P. Bhat, "Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review", *Food Res. Int.* Vol. 44, 7, 2011, pp.1800-1811.
6. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). "Cierre de la producción Agrícola por estado." 2011. http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
7. C. R. Elevitch, H. I. Manner. "Artocarpus heterophyllus (jackfruit). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawai 'i." (2016).
8. T. K. Bose, "Jackfruit", in *Fruits of India: Tropical and subtropical naya prokas*. Calcutta, India, 1985, pp. 488-497.
9. J. Crane, C. Balerdi, I. Maguire, "Jackfruit growing" in *The Florida home landscape*, Florida Cooperative Extension Service, University of Florida, HS-882, 2005, pp.1-10.
10. J. Morton, "Jackfruit", in *Fruits of warm climates*, (Creative Resource Systems, Inc. Winterville, N.C 1987), pp. 58-64.
11. F. A. Chowdhury, M. A., Raman, A. J. Mian, "Distribution of free sugars and fatty acids in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*)", *Food Chem.*, Vol.60, 1, 1997, pp. 25-28.
12. N. Haq, J. T. Williams, R. W. Smith, Z. Dunsiger, "Jackfruit: *Artocarpus Heterophyllus*" Southampton Centre for Underutilised Crops., England, UK, 2006) pp. 192.
13. F. N. Ko, Z. J. Cheng, C. N. Lin, C. M. Teng, "Scavenger and antioxidant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*", *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 25, 2, 1998, pp. 160-168.
14. I. Chanda, S. R. Chanda, S. K Dutta, "Anti-inflammatory Activity of a Protease Extracted from the Fruit Stem Latex of the Plant *Artocarpus heterophyllus* Lam." *RJPPD.*, Vol.1, 2, 2009, pp. 70-72.
15. B. L. Wei, J. R. Weng, P. H. Chiu, C. F., Hung, J. P. Wang, C. N. Lin, "Antiinflammatory flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus communis*", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.53,10, 2005, pp. 3867-3871.
16. R. L. Prior, G. Cao, "Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications", *HortScience* Vol. 35, 4, 2000, pp. 588-592.
17. P. Fellows, "Pasteurisation," in *Food Processing Technology: Principles and Practice* (CRC Press, New York, NY, 2000), Chapter 12, pp. 381-394.
18. S. Jeyamkondan, D. S. Jayas, R. A. Holley, "Pulsed electric field processing of foods: a review", *J. Food Prot.*, Vol. 62, 9, 1999, pp. 1088-1096.
19. B. Acevedo, M. Montiel, J. Avanza, "Estudio cinético de la degradación de la actividad antioxidante hidrosoluble de jugos cítricos por tratamiento térmico", *FACENA*, Vol. 20, 1, 2004, pp. 91-95.
20. L. Téllez, J. Ramírez, C. Pérez-Lamela, M. Vázquez, J. Simal-Gándara, "Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos", *CyTA*, Vol. 3, 2, 2001, pp. 66-80.
21. F. Harte, L. Luedecke, B. Swanson, G. Barbosa-Cánovas, "Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing", *J. Dairy Sci*, Vol. 86, 4, 2003, pp. 1074-1082.
22. S. Bendicho, F. A. R. Marsellés, C. G. V. Barbosa, B. O. Martín, "High intensity pulsed electric fields and heat treatments applied to a protease from *Bacillus subtilis*. A comparison study of multiple systems", *J. Food Eng.*, Vol. 69, 3, 2005, pp. 317-323.
23. B. J. A. Guerrero, G. V. Barbosa-Canovas, "Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and polyphenoloxidase in mango nectar treated with UV light", *J. Food Prot.*, Vol. 69, 2, 2006, pp. 362-368.
24. C. G. V. Barbosa, J. Rodríguez, "Update on nonthermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound", *Food Australia*, Vol. 54, 11, 2002, 513-520.
25. M. Ashokkumar, D. Sunartio, S. Kentish, R. Mawson, R., L. Simons, K. Vilku, C. K. Versteeg, "Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system", *IFSET*, Vol. 9, 2, 2008, pp. 155-160.

26. A. M. Seçkin, R. Temizkan, B. M. Burak, C. Caner, "An innovative technique for extending shelf life of strawberry: Ultrasound", *LWT*, Vol. 52, 2, 2013, 1 – 9.
27. R. Azuola, P. V. Aguilar, "Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA)", *Tecnología en marcha*, Vol. 20, 4, 2007, pp. 30-40.
28. J. Wang, X. Hu, Z. Wang "Kinetics models for the inactivation of *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM14558T and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922T in apple juice by ultrasound", *Int. J. Food Microbiol.*, 139, 3, 2010, pp. 177–181.
29. A. Adekunle, B. K. Tiwari, A. Scannell, P. J. Cullen, C. O'Donnell "Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice", *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 137, 1, 2010, pp. 116-120.
30. M. Valero, N. Recrosio, D. Saura, N. Muñoz, N. Martí, V. Lizama, "Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing", *J. Food Eng.*, Vol. 80, 2, 2006, 509–516.
31. J. Sevilla (2009). *Osmosis*. En línea: <http://es.slideshare.net/joaquin.sevilla/osmosis-v5>. Acceso 17/03/2015.
32. J. Burgos, J. A. Ordonez, F. Sala, "Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* spores", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 24, 3, 1972, pp. 497-498.
33. B. Sanz, P., Palacios, P., Lopez, J. A. Ordonez, "Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores," In *Fundamental and applied aspects of bacterial spores* (Academic Press, New York, NY, 1985), pp. 251-259.
34. M. Zenker, V. Heinz, D. Knorr, "Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods", *J. Food Prot.*, Vol. 66, 9, 2003, pp.1642-1649.
35. P. Piyasena, E. Mohareb, R. C. McKellar, "Inactivation of microbes using ultrasound: a review", *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 87, 3, 2003, pp. 207-216.
36. B. K. Tiwari, C. P. O'Donnell, K. Muthukumarappan, P. J. Cullen, "Effect of ultrasound processing on the quality and nutritional properties of fruit juices", *Stewart Postharvest Review*, Vol. 4, 5, 2008, pp. 1-6.
37. CODEX, STAN. "STAN 247-2005." *Codex Gen. Stand. Fruit Juices and Nectars*. Rome: Food and Agriculture Organization (2005).
38. F. C. Stintzing, K. M. Herbach, M. R. Mosshammer, R. Carle, W. Yi, S. Sellapan, C. C. Akoh, R. Bunch, P. Felker, "Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) clones", *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, 2, 2005, pp. 442 – 451.
39. N. Dürüst, S. Dogan, Y. Dürüst, "Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey)", *J. Agric. Food Chem.* Vol. 45, 6, 1997, pp. 2085-2087.
40. E. M. Kuskoski, A. G. Asuero, A. M. Troncoso, J. Mancini-Filho, R. Fett, "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos", *LWT*, Vol. 25, 4, 2005, 726-732.
41. F. J. Morales, S. Jimenez-Perez. "Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence", *Food Chem.*, Vol. 72, 1, 2001, pp. 119-125.
42. Y. Villareal, D. F. Megia, O. Osorio, A. F. Cerón, "Effect of pasteurization on sensory characteristics and content of vitamin c in fruit juices", *Bio. Agro.* Vol. 11, 2, 2013, pp. 1692-3561.
43. B. K. Tiwari, C. P. O'Donnell, K. Muthukumarappan, P. J. Cullen, "Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice", *LWT*, Vol. 42, 3, 2009, pp. 700-704.
44. L. N. Lieu, "Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing," *Ultrason. Sonochem.*, Vol. 17, 1, 2010, pp. 273-279.
45. V. Sathirasegaram, Z. Razali, C. Somasundram, "Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice", *Ultrason. Sonochem.* Vol. 20, 5, 2013, pp. 1276–1282.
46. Q. Y. Zafra-Rojas, N. Cruz-Cansino, E. Ramírez-Moreno, L. Delgado-Olivares, J. Villanueva-Sánchez, E. Alanís-García, "Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice," *Ultrason. Sonochem.*, Vol. 20, 5, 2013, pp. 1283-1288.
47. N. Cruz-Cansino, E. Ramírez-Moreno, J. E. León-Rivera, L. Delgado-Olivares, E. Alanís-García, J. A. Ariza-Ortega, J. J. Manríquez-Torres, D. P. Jaramillo-Bustos, "Shelf life,

- physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment." *Ultrason. Sonochem.*, Vol. 27, 2015, pp. 277-286.
48. R. M. Aadil, X. A. Zeng, Z. Han, D. W. Sun, "Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice." *Food Chem.*, Vol. 141, 3, 2013, pp. 3201-3206.

FITODESALINIZACIÓN DE AGUAS SALOBRES POR MEDIO DE LA HALÓFITA *BACOPA MONNIERI*.

Hazael Ramiro Ceja Gálvez¹, Dioselina Álvarez Bernal², Marcos Alfonso Lastiri Hernández²,

¹Instituto Tecnológico de Jiquilpan, ²Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Michoacán.

RESUMEN

En México los problemas de salinización de suelos son cada día mayores, el origen de este problema se relaciona con el uso de agua de mala calidad para riego. Sin embargo, poco se sabe de los sistemas biológicos para el tratamiento de aguas salobres por medio de plantas que poseen un alto potencial para extraer enormes cantidades de sodio. Una especie poco estudiada en cuestiones de desalinización es *Bacopa monnieri* Pennell, una suculenta que crece en condiciones de estrés salino. El objetivo de este trabajo fue evaluar su capacidad de fitodesalinización a nivel invernadero. Las variables biométricas medidas fueron, peso fresco y peso seco, así como la conductividad eléctrica (Ce) y el pH del agua. El experimento se desarrolló bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones para cada tratamiento (en condiciones de fertilización y no fertilización), a diferentes concentraciones de salinidad empleando cloruro de sodio a 0 mmol (testigo), 50 mmol, 100 mmol, 200 mmol, 400 mmol y agua de riego. En los tratamientos se colocaron 150gr de *B. monnieri* libre de suelo en tinas con 3L de agua. Al término del experimento se realizó un análisis de varianza para examinar los efectos de los abonos en cada una de las variables evaluadas; la prueba de Tukey se utilizó para detectar diferencias entre los valores medios de las variables por tratamiento. En los resultados se observó una respuesta significativa entre los tratamientos, los que mostraron mayor rendimiento de biomasa fueron *B. monnieri* a 200 mM y 400 mM sin fertilizar, así como reducciones de Ce y pH en el agua. Se concluye que la utilización de la especie *B. monnieri* puede ser una alternativa sustentable para disminuir la problemática ambiental que presentan los cuerpos de agua con altas concentraciones de sales.

INTRODUCCIÓN

El agua es una parte vital en la vida cotidiana del ser humano, ya que ayuda a la supervivencia del mismo, así como en la realización de procesos industriales, la ganadería y la producción agrícola. La demanda de producción de alimentos cada día es mayor, debido al aumento de la población en todo el mundo, por lo que los agricultores han tratado de aumentar la producción agrícola, sin embargo, la disponibilidad de suelos de calidad es limitada; Ya que muchos de estos son afectados por problemas de salinización, especialmente por el uso de aguas salobres, esta condición se ve acrecentada en zonas áridas y semiáridas.

En México los procesos de salinización de suelos son cada día mayores, el 30% de los 5.5 millones de hectáreas que son irrigadas están afectadas por la salinidad (Bronwyn et al., 2007). Así también en la región Ciénega de Chapala existen zonas con suelos salinos, en el municipio de Villamar los canales o drenes con los que son irrigados los suelos agropecuarios de esta región provocan un deterioro acelerado en la calidad de los suelos lo que ha repercutido en pérdidas económicas debido a una baja en la producción y calidad de las cosechas.

Un agua de riego deficiente de calidad química, puede ocasionar diferentes trastornos como son problemas de acumulación de sales en el suelo que afectan la disponibilidad de agua para el cultivo, además de problemas de permeabilidad afectando la infiltración del agua en el suelo y toxicidad por iones específicos los cuales son absorbidos y acumulados en los tejidos de las plantas afectando su metabolismo (Miranda & Ruiz, 1982).

Por lo que se requiere buscar de un tratamiento adecuado a dichas aguas antes de ser utilizadas en el riego. Uno de los tratamientos más utilizados en la desalinización de aguas, son los tratamientos fisicoquímicos, pero su eficacia es limitada y de un costo muy elevado, por lo que se busca implementar uno de los biotratamientos utilizados en los últimos tiempos que es la fitorremediación de aguas (proceso bioquímico que por medio de las plantas asimila diferentes compuestos presentes en el agua), el cual tiene un costo considerablemente bajo en comparación con los demás tratamientos, además de ser una opción sustentable (Delgadillo et al., 2011). Una de las plantas que se utilizan para la asimilación de sales son las halófitas, plantas tolerantes a la salinidad, capaces de absorber iones en exceso a sus necesidades nutritivas (Correal et al., 2011).

PARTE EXPERIMENTAL

Área de estudio

El proyecto se basa en la desalinización de aguas salobres para riego de cultivos, por lo que el área de estudio abarca distintas soluciones de agua preparadas con diferentes problemáticas de concentraciones de salinidad, además de una muestra problema obtenida del dren principal para riego del municipio de Villamar en la región noroeste del estado de Michoacán, en la Ciénega de Chapala.

El municipio de Villamar (19°35'42"N 99°15'03"O) se localiza a una altura de 1,540 metros sobre el nivel del mar, con un clima templado con lluvias en verano y una precipitación pluvial anual de 900 milímetros y temperaturas que oscilan entre 10.4° y 25. 4° centígrados, de acuerdo a información del estado; además existe una región denominada "los negritos" una zona geotérmica, donde hay una zona de pequeños volcanes hirvientes y un pequeño lago con agua salada de unos 400 m de superficie el cual se observa en la fig. 1. Se cree que el problema de salinidad del dren de Villamar se deba al mal manejo de las aguas residuales de la región, además de las sales obtenidas de la zona geotérmica.



Figura 6. Lago de agua salobre los "negritos".

Muestreo de agua.

Se procedió a recolectar agua de riego del dren principal del municipio de Villamar en la región Ciénega de Chapala (20.046238, -102.605337), de acuerdo al procedimiento de muestreo en canales y colectores de la norma NMX-AA-3-1980, recolectando aproximadamente un total de 8 L de agua de riego para el montaje del experimento.

Muestreo de planta.

En el biotratamiento se utilizó una suculenta que crece en condiciones de estrés salino en la región Ciénega de Chapala, *Bacopa monnieri* Pennell que ha sido poco estudiada en temas sobre desalinización.

Se recolectó *Bacopa monnieri* en las orillas del lago de los negritos (municipio de Villamar) en las coordenadas 20.061637, -102.611478; se extrajeron aproximadamente 2.5 Kg de planta con suelo, para evitar algún daño a la raíz de esta, en la fig. 2 se observa como la planta se colocó en una tina para evitar el maltrato durante el transporte para su implementación en el experimento.



Figura 7. *B. monnieri* recolectada en tina para su transporte.

Montaje del experimento.

El experimento se elaboró en los invernaderos del CIIDIR, se realizaron dos biotratamientos a diferentes concentraciones de salinidad en el agua, el experimento tuvo una duración de 12 semanas.

En el primer tratamiento se realizaron diez repeticiones de seis tinas con 150 gr de la planta halófila *B. monnieri*, cada una de ellas con 3 L de agua con las siguientes concentraciones de salinidad (NaCl): 0 mmol (testigo), 50 mmol, 100 mmol, 200 mmol, 400 mmol y el agua de riego obtenido de los canales de irrigación en el municipio de Villamar, se optaron por estas concentraciones ya que en estudios anteriores sobre remoción de Na^+ y Cl^- según Hernández (2016) plantas halófitas (*Beta vulgaris*) pueden sobrevivir a concentraciones mayores de 150 mmol afectando solo su morfometría; en la fig. 3 se observa el tratamiento testigo de *B. monnieri* ya montado.



Figura 8. Tratamiento testigo de *B. monnieri*.

En el segundo tratamiento se usaron diez repeticiones de seis tinas con 3 L de agua en las cuales se colocó a cada una de ellas 150 gr de la planta halófila *B. monnieri* con 0.5 gr de fertilizante (18 - 18 - 18 + Mg +ME) que se prevé potencializará la fitodesalinización, con las siguientes concentraciones de salinidad (NaCl): 0 mmol (testigo), 50 mmol, 100 mmol, 200 mmol, 400 mmol y el agua de riego obtenido de los canales de irrigación del municipio de Villamar.

En la fig. 4 se puede observar el montaje del experimento terminado en la espera de las doce semanas para la terminación del proyecto.



Figura 9 Experimento terminado: las tinajas inferiores son de *B. monnieri* y las superiores son *B. monnieri* con fertilizante.

Parámetros analizados.

Cada tratamiento se monitoreó durante las 12 semanas de implementación, se optó por medir cada semana los valores de CE y pH bajo las normas NMX-AA-093-SCFI-2000, NMX-AA-008-SCFI-2011 y el método APHA-AWWA-WEF (2005), mediante los equipos duales (potenciómetro y conductímetro): HANNA - HI 98129 y HANNA - HI 5521 (de mayor rango y precisión).

Además, se midió el peso húmedo de la planta y la cantidad de volumen de agua perdida por la evaporación o adsorción de la planta (adicionando la cantidad de agua necesaria para mantener su volumen inicial); así como las diferentes condiciones climáticas en las que se encuentra como son temperatura y humedad.

Al término de las 12 semanas se colocaron las plantas en un horno a 70 °C durante 48 horas para la obtención del peso seco.

RESULTADOS

Al término de las doce semanas de implementación se obtuvieron datos relevantes de los experimentos, los dos tratamientos de fitodesalinización de *B. monnieri* con y sin fertilizante produjeron cambios considerables en la biomasa, CE y pH; en estudios anteriores según Mamani (2016) la planta *B. monnieri* tiene gran desarrollo de biomasa en condiciones de invernadero, pero también sufre de disminución de su ciclo vital por sintomatología de clorosis a altas concentraciones. Para mantener el sistema del experimento homogéneo, cada semana se le agregó el agua perdida por evaporación o adsorción de la planta y el agua añadida contenía los siguientes parámetros: CE = 0.5 dS/m y pH de 8.81, por lo que los tratamientos se vieron forzados a asimilar la concentración de salinidad inicial más la agregada cada semana en el agua añadida. En la tabla 1 se muestran los datos iniciales y finales de cada experimento de la CE, pH, peso húmedo y peso seco.

Tabla 18 Resultados iniciales y finales del experimento

TRATAMIENTO	PH		CE (DS/M)		PESO HÚMEDO (G)		PESO SECO (G)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
B-0	7.37	9.08	0.65	1.61	151.29	272.63	15.2828	28.8017
B-50	7.44	8.65	6.6	4.41	151.26	224.07	15.2828	21.1924
B-100	7.39	8.55	11.88	10.88	150.73	198.57	15.2828	18.5812
B-200	7.52	8.74	22.73	17.23	150.83	147.12	15.2828	7.2181
B-400	7.37	9	41.56	33.25	150.22	45.33	15.2828	4.364
B-AR	6.77	8.93	0.8515	2.01	150.77	219.9	15.2828	26.0356
BF-0	7.37	8.98	0.65	1.58	150.25	252.66	15.2828	26.9975
BF-50	7.44	8.83	6.6	4.62	150.24	248.94	15.2828	24.5022
BF-100	7.39	8.66	11.88	10.27	150.62	194.31	15.2828	17.0832
BF-200	7.52	9.04	22.73	24.96	150.94	93.98	15.2828	12.0977
BF-400	7.37	9.14	41.56	32.78	150.25	58.35	15.2828	6.0107
BF-AR	6.77	9.09	0.8515	2	150.62	253.84	15.2828	23.6036

(B = Bacopa y BF = Bacopa + Fertilizante), 0= Testigo, 50, 100, 200, 400= concentración de sales; AR= agua de riego.

En la tabla anterior se observó que todos los tratamientos tuvieron un aumento de pH debido a que las plantas disociaron las sales que se encontraban en las aguas, acumulando iones hasta la alcalinización de esta. Con respecto a la conductividad todos los tratamientos redujeron su rango, excepto los valores más bajos como fueron los testigos y el agua de riego del dren Villamar, donde la planta se encontraba en una zona de confort y solo adsorbía las sales necesarias para su desarrollo por lo que fueron estas plantas las que desarrollaron un mayor crecimiento tanto en peso húmedo y peso seco, ya que no se encontraban en ningún estrés salino.

La media de todos los experimentos fue de pH = 8.8903, la variación del pH en cada tratamiento tuvo una variación destacada, en general los tratamientos que tuvieron un mayor aumento de pH fueron los tratamientos fertilizados, siendo el tratamiento de 400 mmol quien obtuvo un mayor aumento en el pH con un pH= 9.14 y el menor fue el tratamiento sin fertilizar de 100 mmol con un pH= 8.55, en la fig. 5 se observa la grafica en la cual se indica la tendencia que tuvieron estos dos tratamientos (de mayor y menor crecimiento) a lo largo de las 12 semanas de implementación.

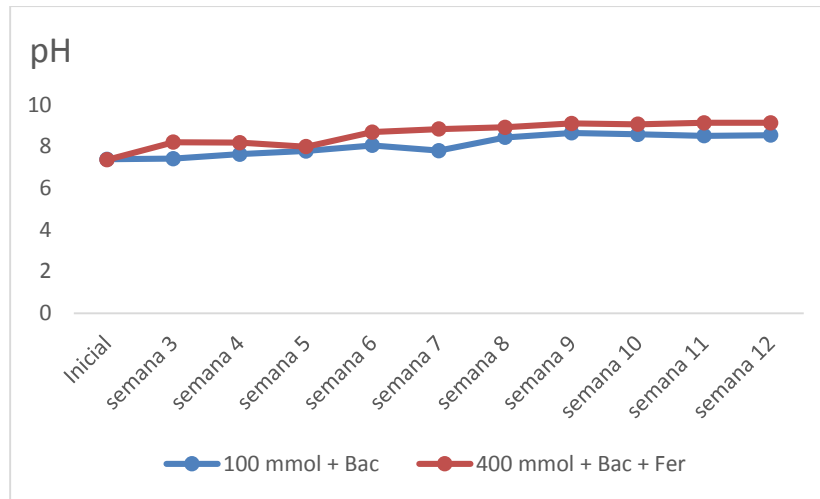


Figura 10. Graficas con tratamientos con mayor y menor aumento de pH, BF- 400 y B- 100 respectivamente durante las doce semanas de implementación.

La media de todos los experimentos fue de $CE = 12.1333333$, la variación de la CE en cada tratamiento tuvo una variación destacada, en general los tratamientos que tuvieron un mayor rendimiento en la disminución de CE fueron los tratamientos fertilizados, siendo el tratamiento de 400 mmol quien obtuvo una mayor disminución de CE, siendo su valor inicial de $CE = 41.56$ dS/m hasta bajarlo a una $CE = 32.78$ dS/m y el tratamiento que tuvo un menor rendimiento fue el de agua de riego sin fertilizar aumentando de 0.65 a 1.61 dS/m de CE. Sin embargo las aguas con $CE < 0,7$ dS/m no tienen ningún grado de restricción de uso para riego y aguas con $CE > 3,0$ dS/m tienen un grado de restricción severo y aguas entre ambos valores de CE tienen un grado de restricción moderado (Aragüés, 2011), por lo que todas las muestras se encuentran con problemas de calidad para riego sin importar la disminución de estas; en la fig. 6 se observa la gráfica en la cual se indica la tendencia que tuvieron estos dos tratamientos (de mayor y menor crecimiento) a lo largo de las 12 semanas de implementación.

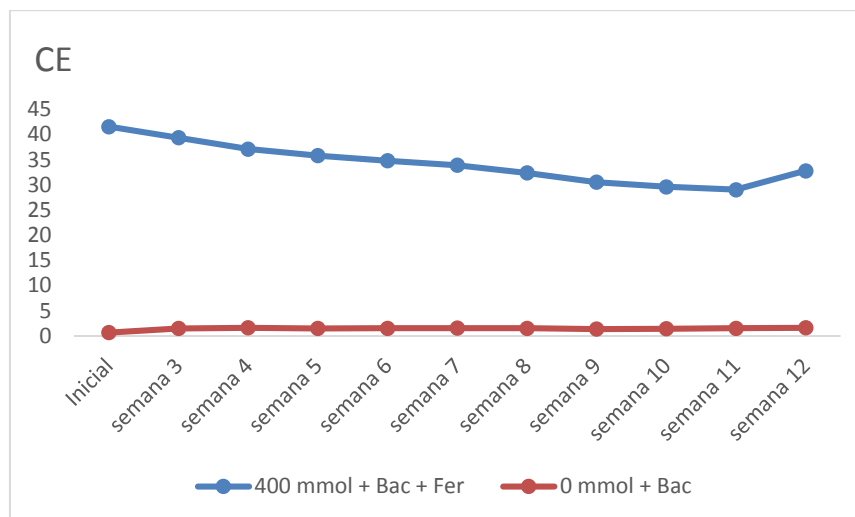


Figura 11 Graficas con tratamientos con mayor y menor aumento de CE, BF- 400 y B- 0 respectivamente durante las doce semanas de implementación.

La media de todos los experimentos fue de 184.1416667 g, la variación de peso húmedo en cada tratamiento tuvo una variación destacada, en general los tratamientos que tuvieron un mayor crecimiento fueron los tratamientos fertilizados y sin fertilizar con menor rango de concentración de salinidad (NaCl), como se observa en la fig. 7.



Figura 12 Experimento montado en la semana 12 (de inferior a superior concentración de salinidad).

El tratamiento testigo sin fertilizar es que tuvo un mayor desarrollo, siendo su peso húmedo final de 272.6 g y el tratamiento que tuvo un menor crecimiento fue el de 400 mmol sin fertilizar con un peso húmedo de 45.33 g; en la fig. 8 se observa la gráfica en la cual se indica la tendencia que tuvieron estos dos tratamientos (de mayor y menor crecimiento) a lo largo de las 12 semanas de implementación.

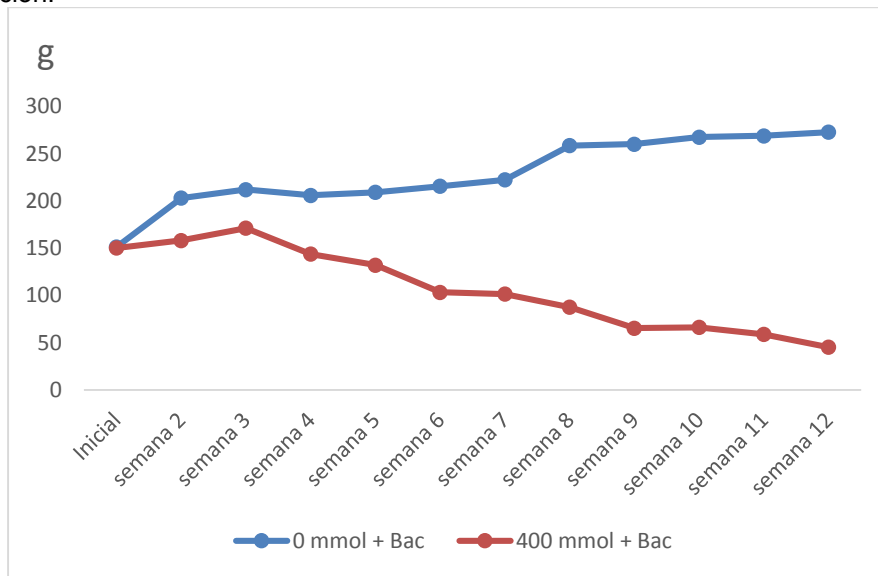


Figura 13 Graficas con tratamientos con mayor y menor aumento de peso húmedo, B- 0 y B- 400 respectivamente durante las doce semanas de implementación.

La media de todos los experimentos fue de 18.040658 g, la variación de peso seco en cada tratamiento fue de considerarse, los tratamientos que tuvieron un mayor peso seco fueron los tratamientos fertilizados y sin fertilizar con menor rango de concentración de salinidad (NaCl); el tratamiento testigo sin fertilizar es el que tuvo un mayor peso seco con 28.8 g y el tratamiento que tuvo un menor peso seco fue el de 400 mmol sin fertilizar con 4.36 g.

A continuación, en la fig. 9 se observan los cambios producidos en las plantas en los tratamientos que tuvieron un mayor y menor crecimiento durante todo el desarrollo del experimento, que fueron el tratamiento testigo sin fertilizar y el de 400 mmol sin fertilizar donde la planta tuvo una mayor disminución de salinidad acorde a su CE, sin embargo se cree que parte de su disminución no se debió a la planta ya que esta murió casi en su totalidad, si no fue por la presencia de un alga que se encontraba asociada a la *B. monnieri*.

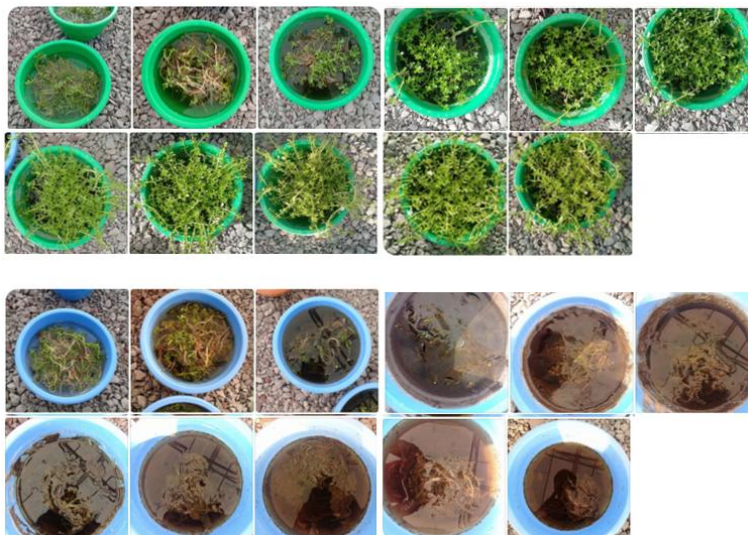


Figura 14 Desarrollo de los tratamientos testigo sin fertilizar (superior) y 400 mmol sin fertilizar (inferior) durante las 12 semanas de implementación del experimento.

CONCLUSIONES

La utilización de la especie *B. monnieri* puede ser una alternativa sustentable para disminuir la problemática ambiental que presentan los cuerpos de agua con altas concentraciones de sales, ya que se presentó una disminución significativa; además se comprobó que *B. monnieri* es efectiva con y sin fertilización para la fitodesalinización. Sin embargo, la fertilización ayudo ligeramente a la potencialización de su efectividad en la disminución de conductividad eléctrica, pero no ayudo al aumento de la biomasa de la planta en comparación con los tratamientos no fertilizados.

BIBLIOGRAFÍA

1. APHA-AWWA-WEF (2005). "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 21th Edition. New York, 2-44 a 2-48, method 2510 y 2-48, method 2520.
2. R. Aragüés Lafarga, (2011). "Agricultura de regadio y calidad de aguas a nivel fuente y sumideros". Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, 24-34.
3. E. Correal Castellanos, J. Silva Colomer, J. Boza López, & C. Passera, (2011). "Valor nutritivo de cuatro arbustos forrajeros del género Atriplex (*A. nummularia*, *A. cyncrea*, *A. undidata* y *A. lampa*)". Pastos, 177-189
4. E. A. Delgadoillo Lopez, C. A. González Ramírez, F. Prieto García, J. R. Villagómez Ibarra, & O. Acevedo Sandoval, (2011). "FITORREMEDIACIÓN: UNA ALTERNATIVA PARA ELIMINAR LA CONTAMINACION". Tropical and subtropical agroecosystems, 597- 612.
5. I. Hernandez Montiel, (2016). "REMOCIÓN DE Na⁺ Y Cl⁻ DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA HIDROPÓNICA UTILIZANDO PLANTAS DE ACELGA (*Beta vulgaris* var. Cicla L.)

SOMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl". La Paz, Baja California Sur: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR.

6. J. Bronwyn Barkla, R. Vera Estrella, O. Pantoja, & E. Balderas, (2007). "Mecanismos de tolerancia de a la salinidad a las plantas".
7. J. L. Mamani López, (2015). "BIOACUMULACIÓN DE SELENIO EN *Bacopa monnieri* L. (HISOPO DE AGUA) BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO". Arequipa, Perú: UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA.
8. O. Miranda N., & R. Ruiz Sch., (1982). "Calidad del agua de riego. Investigación y Progreso", 41- 42.
9. NMX-AA-008-SCFI-2011.
10. NMX-AA-093-SCFI-2000.

HORTALIZAS DE TRASPATIO COMO ALTERNATIVA PARA LAS ÁREAS MARGINADAS DE MÉXICO

Juan Valente Megchún-García^{1*}, Martín Ramos-Castellanos², Ángel Capetillo-Burela⁴, Daniel Arturo Rodríguez-Lagunes¹, María del Refugio Castañeda-Chávez³, Joaquín Murguía-González¹, Fabiola Lango-Reynoso³, Otto Raúl Leyva-Ovalle¹

¹Universidad Veracruzana, ²MORECASYS A. C., ³Instituto Tecnológico de Boca del Río, ⁴Earthnote México, S. A. de C. V.

RESUMEN

La horticultura de traspatio es una alternativa para mejorar la alimentación de las familias mexicanas, y además permite obtener un ingreso adicional por la venta del exceso de cosechas a nivel local. El estado de Chiapas es considerado uno de los de mayor población en las zonas urbanas y periurbanas que se dedican a la agricultura de autoconsumo, principalmente donde hay presencia indígena. Con el objetivo de transferir a las familias la importancia de establecer hortalizas de traspatio se realizaron diversas capacitaciones teóricas-prácticas sobre la producción de hortalizas de traspatio con manejo orgánico. El trabajo se realizó en el municipio de Berriozabal, Chiapas; el cual se localiza en las coordenadas de 16° 48'00" Norte y 93° 16'22" Oeste y la región I Valle de Jiquipilas ubicado a 16° 40'06" Norte y 93° 38'40" Oeste con una altura sobre el nivel del mar de 540 metros. Las capacitaciones a productores se realizaron de manera grupal con el apoyo de cartas descriptivas y el uso de un plan de formación, los temas teóricos-prácticos que se impartieron fueron sobre la construcción de huertos hortofrutícolas, elaboración de abonos orgánicos, control de plagas y enfermedades. Se capacitaron a productores de los cuales el 28% pertenece al municipio de Berriozabal y del municipio de Jiquipilas, el 41% son de la localidad de Baja California y el 31% de la localidad de Pino Suárez, del total de los productores participantes el 17% son hombres y 83% son mujeres, quienes obtuvieron conocimiento sobre el manejo agronómico para la producción de hortalizas de traspatio. Del total de los participantes el 41% adoptaron la tecnología y el 59% asistió a los cursos de capacitación. El 83% del total de las mujeres que se dedican al hogar realizaron la actividad y lograron establecer un módulo de hortalizas en el traspatio.

Palabras claves: Horticultura, traspatio, solar.

INTRODUCCIÓN

Chiapas, México es considerado uno de los estados que concentra en las zonas rurales y semirurales al menos 15,000 habitantes, destacando como una de las principales actividades a la agricultura destinada principalmente para el autoconsumo, como lo es el caso de Huitepec de San Cristóbal. En este municipio se realiza en más del 50% de los hogares, principalmente en las zonas donde hay presencia indígena (Calderón y Soto, 2013). Si a esto le sumamos que la pobreza alimentaria aumentó de 14 a 20 millones de habitantes, esto hace necesario iniciar con la pluriactividad, concepto que se entiende como producir en el interior de la familia.

La producción de hortalizas de traspatio funciona como una estrategia cambiante de acuerdo a la dinámica de las familias y la relación con la estructura agraria, el traspatio o huerto familiar y se inserta como una reserva vegetal aledaña a la casa habitación, donde se refleja su identidad, cultura y su relación con la naturaleza (Lopez *et al.*, 2013). Jiquipilas es una población con un alto grado de marginación al igual que el municipio de Berriozabal, pertenecen a la región I Centro de Chiapas, donde existe una alta degradación de suelo y pérdida de los recursos naturales; la Unidad de Producción Familiar (UPF), constituye una alternativa apropiada para que la familia produzca sus alimentos a bajo costo, frescos y saludables para alcanzar una dieta balanceada, debido a que en el solar y traspatio se pueden producir hortalizas, frutales, plantas comestibles, aromáticas y medicinales, huevos y carne de aves. Con la horticultura de traspatio se contribuye a mejorar la alimentación y prevenir enfermedades como la obesidad, enfermedades degenerativas y desnutrición (Toral *et al.*, 2012). Por todo lo anterior fue necesario realizar en algunas localidades de Jiquipilas y Berriozabal, Chiapas, capacitaciones teórico-prácticos sobre horticultura de traspatio, como alternativa mejorar las condiciones de alimentación de las familias Chiapanecas.

La agroecología es indispensable para el desarrollo de las capacidades, para la generación de técnicas que se puedan implementar en el traspatio, en las últimas décadas la sociedad y la industria

agroalimentaria ha sufrido crisis sociales, ecológicas y sanitarias graves, provocando que cerca de un billón de personas a escala mundial, se vea afectado por la seguridad alimentaria y por los índices de la pobreza que van en aumento (Duche *et al.*, 2017). Por lo que es necesario generar técnicas que nos permita obtener alimentos sanos e inoocuos para el autoconsumo, el suelo es un recurso indispensable para la vida que nos permite el desarrollo y producción de las plantas, los animales y el hombre Gros *et al.*, 1992). Sin embargo, aún no se reconocen todas las funciones que este realiza, por lo que el concepto general de suelo y fertilidad, nos permite entender lo importante que es ante una población que van en aumento. El suelo es importante para la adquisición de superficie para la producción de alimentos y para la construcción de viviendas, por lo tanto el solar desempeña una función importante en la producción de alimentos para el autoconsumo; y con la creación de abonos orgánicos que son provenientes de los desechos orgánicos, es posible nutrir un suelo que después será utilizado para la siembra de hortalizas y frutales (Cerrato *et al.*, 1992).

En los últimos años las personas demandan alimentos sanos que garanticen el bienestar de la familias, sin embargo la falta de conocimiento sobre el uso de los recursos como el suelo, agua y planta, nos permite generar estrategias, modelos de transferencia de tecnología, que nos ayude a capacitar a las personas de bajos recursos, que no tienen acceso a una alimentación sana y a servicios para mejorar su calidad de vida, por lo que el desarrollo de capacidades a través de la capacitación es indispensable para generar modelos de transferencia de tecnología sobre horticultura de traspatio, con el propósito de producir alimentos sanos y contribuir a la mitigación de la polución medioambiental. No obstante, aún no existen criterios universales para evaluar los cambios en la calidad de vida, pero si estrategias para mitigar el hambre y la pobreza y para ello las condiciones edáficas y las condiciones edafoclimáticas, entre otras características, juegan un papel importante en la horticultura familiar (Higa y Parr, 1995).

En este sentido, los abonos orgánicos constituyen una alternativa para disminuir la dependencia de productos químicos artificiales en los cultivos agrícolas, debido que cada vez son más utilizados en cultivos intensivos, que en concentraciones elevadas pueden causar daños a la salud pública, y además daños a los recursos ecológicos, por ejemplo los daños al suelo cuando se ven afectadas sus propiedades químicas, físicas y biológicas, está ya no está en la condición de brindar los alimentos, de proveerla el humus, que la mantiene viva, así como ocurre en la naturaleza (Vandevivere y Ramírez, 1995). Aunado a lo anterior, los abonos orgánicos presentan efectos sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y que lo hacen de cierta forma es aumentar su fertilidad; además que para su preparación de los abonos orgánicos, solamente se requiere de un área pequeña de tierra, paciencia y constancia durante dos o tres meses para su posterior aplicación al suelo y al cultivo, por lo que un espacio en el solar es suficiente para producir alimento (Yuste, 1998). Por otro lado, otra parte fundamente de la agricultura orgánica es el control de plagas y enfermedades; por lo que se han generado técnica para el control de fitosanitario con el uso de repelentes naturales que nos permita obtener alimentos libres de agroquímicos, como lo son el uso microorganismos benéficos. El presente trabajo fue con el propósito de capacitar a las personas de integrar la familia sobre horticultura de traspatio, con técnicas de manejo agronómicas y de agricultura familiar y orgánica para la producción de alimentos en el solar.

PARTE EXPERIMENTAL

Como parte del "PROYECTO INTEGRAL DE INNOVACIÓN Y EXTENSIONISMO " DESARROLLO DE PRODUCCIÓN BASICA PARA ALIMENTOS" (PIIEX-07-2014-019), se implementó un Programa de Integral de Innovación y Extensionismo para el Desarrollo de la producción en la región I Metropolitana en el municipio de Berriozabal, Chiapas ubicado en las coordenadas geográficas 16° 48' 00'' Norte y 93° 16' 22'' Oeste y la región I Valle del municipio de Jiquipilas ubicado en las coordenadas 16°40' 06'' Norte y 93° 38' 40'' Oeste del estado de Chiapas, donde se implementó a través de capacitación y asistencia técnica a productores. A través de la transferencia del conocimiento y mejorar sus capacidades para desarrollar agricultura de traspatio. Los lugares que fueron atendidos son el municipio de Berriozabal y las localidades de Baja california y Pino Suárez de Jiquipilas Chiapas.

Esto consistió en convocar a las personas interesadas en recibir capacitación en Hortalizas de traspatio y realizar reuniones para integrar los grupos, a través de un plan de formación y cartas descriptivas. Los cursos se impartieron el 30 de septiembre, el 3 y 7 de octubre, el 5, 12, 13 y 18 de

noviembre, el 4, 5 y 9 de diciembre del 2014; los temas que se impartieron a través de talleres fueron: Producción de hortalizas de traspatio; elaboración de abonos orgánicos y Manejo integral de las plagas y enfermedades (MIPE).

Para lograr la transferencia del conocimiento se realizó con el apoyo de material didáctico con manuales de capacitación, y material audiovisual, entre las semillas que se utilizaron para los cultivos fueron semillas de rabano (*Raphanus sativus*), cilantro (*Coriandrum sativum*), calabacita (*Cucurbita pepo* Var. Italiana) y lechuga (*Lactuca sativa*). Para la elaboración de los abonos, se utilizó melaza, levadura, agua, rastrojo ó hojarasca, carbón, estiércol y tierra negra. Los principales temas impartidos en los cursos de capacitación fueron básicamente los referentes a las especies recomendadas para su siembra en todo el año, así como la elaboración de algunos insumos orgánicos como insecticidas repelentes, fungicidas y fertilizantes foliares. Todos ellos elaborados con materiales locales, funcionales y de bajo costo.

A continuación se presentan algunas recetas para la elaboración de abonos foliares y bioinsecticidas.

1. Caldo sulfocalcico (insecticida, fungicida, bactericida y fertilizante)

Es un caldo mineral que se utiliza para controlar plagas como trips, ácaros y algunos chupadores; además que controla más de 40 enfermedades ocasionadas por hongos (Roya, ojo de pájaro, tizones, etc); además que aporta nutrientes para el crecimiento, floración y fructificación de las plantas (Ruiz, 1986). (No debe aplicarse en leguminosas como el frijol cuando estas estén en estado de floración).

Ingredientes para preparar 100 litros de caldo sulfocalcico: 10 kg de azufre; 10 kg de cal viva en polvo; un tambo de metal, 100 litros de agua y un buen fogón y leña

Plagas que controla: Ácaros, mosquita blanca, pulgón, trips

Nutrimientos que aporta: Calcio y azufre

Nutrimientos opcionales para fortalecer la mezcla: 100 g de potasa caustica (Hidróxido de potasio) y 100 g de sulfato de zinc

Preparación: Se pone a calentar el agua hasta que empiece a hervir de ahí se agregan los ingredientes para que se disuelva bien el azufre, se agita en el sentido de las manecillas del reloj con un trozo de madera por más de 30 minutos o hasta que tome un color vino tinto que es cuando está listo; sin embargo antes de retirarlo del fuego, se le debe de agregar el agua que se haya evaporado para completar los 100 litros originales. Posteriormente se retira del fuego y se le puede agregar 5 kg de ceniza cernida, y una vez frío se cuele se deposita en tambos oscuros.

Aplicación: Para sandía, melón, calabaza y otras cucurbitáceas, de la mezcla se aplica a razón de $\frac{3}{4}$ de litro en 200 litros de agua o bien 75 ml en 20 litros de agua asperjado al follaje, temprano o por la tarde para que sea absorbido al 100% por la planta. Para jitomate, chile y frijol aplicar de 1 a 3 litros en 200 litros de agua asperjado al follaje, y de preferencia muy temprano o por la tarde para que sea absorbido al 100% por la planta.

Observaciones: Es un inductor de resistencia a plagas y es un caldo caliente.

Aplicando los nutrientes opcionales este caldo se convierte en un súper insecticida para doradilla y todo tipo de plagas y además que se convierte en un súper fertilizante. Puede ser almacenado hasta por un año después de su elaboración.

2. Bioestimulantes (insecticidas, repelentes)

Una forma de controlar naturalmente las plagas de las plantas, es mediante la aplicación de productos líquidos obtenidos de plantas aromáticas o culinarias que por sus características propias de astringencia, grado de pungencia (picante, repugnante) y amargos, controla todo el complejo de plagas y enfermedades de cultivos dependiendo de su variedad y dosis correspondiente. Entre ellos se puede mencionar la tiamina y una serie de ácidos que son repelentes de insectos (ácido cafeico, clorogénico y linoleico) por lo que si utilizamos estos componentes es posible eliminar los insectos que perjudican las plantas o evitar que estos se acerquen. Además que se adicionan ciertos elementos esenciales para el desarrollo de las plantas fortaleciéndolas o endureciendo su cutícula para protegerla de ciertos insectos chupadores. Las plantas biosidas y repelentes procesadas sirven de insecticidas, además, tienen propiedades hormonales y otros reguladores de crecimiento (Restrepo, 1996).

El chile libera una toxina que actúa como repelente, inhibidor de ingesta e incluso como inhibidor de virus. Entre las plagas que controlan se encuentran áfidos, pulgones, hormigas, orugas, escarabajo de la papa, gorgojo del arroz, polilla de la col y plagas de almacén. La cebolla controla áfidos,

pulgones, ácaros y algunas enfermedades causadas por hongos y bacterias y el ajo controla y repele pulgones, áfidos, chinches, moscas y zancudos.

Entre las plantas que se pueden utilizar como adherentes y pegamentos se encuentran la sábila, penca de nopal, cactus y maguey, se usa en la mezcla o macerado cuando la aplicación es foliar o con viento fuerte.

Materiales necesarios: Los materiales que se requieren para su elaboración son: chile, ajo, cebolla, hojas de neen, noni, hojas de plantas del entorno sanas, vinagre, microorganismos locales y una cubeta plástica con tapa.

Preparación. En una cubeta de plástico se deposita el ajo y con un mazo se tritura hasta que esté completamente machacado, después se le adiciona el chile y el resto de productos, una vez machacado se le agrega medio litro de vinagre un litro de microorganismos locales, y se llena con agua; posteriormente se tapa de manera hermética y se deja reposar por 10 días.

Aplicación: Las dosis de producto utilizado varían desde 5 a 20 mL por litro de agua, dependiendo de la edad de la planta.

3. *Caldo de ceniza (insecticida, fungicida y fertilizante orgánico)*

Para preparar 100 litros de agua se necesita lo siguiente.

Ingredientes: 20 kg de ceniza cernida; 2 kg de jabón biodegradable o buen 2 barras de jabón zote; tambo de metal, 100 litros de agua y un buen fogón con leña.

Plagas que controla: Trips, mosquita blanca, pulgón y otros chupadores

Nutrimientos que aporta: La ceniza aporta calcio, silicio, fosforo, potasio entre otros elementos; y lo que se obtiene con este tipo de productos son endurecimientos de los tejidos de la planta para tolerar el ataque de plagas; además de un incremento del peso del fruto y su principal función es controlar cochinillas, escamas y gusanos (Rodríguez y Paniagua, 1994).

Nutrimientos opcionales para fortalecer la mezcla: 100 g de potasa caustica (Hidróxido de potasio) y 100 g de sulfato de zinc

Preparación: Se pone a calentar el agua con los ingredientes antes mencionados, se empieza a agitar dando vuelta en el sentido de las manecillas del reloj hasta que hierva el agua, una vez que empiece a hervir se retira de la lumbre, porque si se deja más tiempo se queman los minerales y ya no sirve. Una vez frío se cuela y listo para usarse.

Aplicación: De la mezcla terminada se depositan de 4 a 6 litros en 200 litros de agua, se puede usar hasta 10 litros de la mezcla en 200 litros de agua y asperjar al follaje muy temprano o por la tarde para que lo absorba la planta al 100%.

Observaciones: Sirve para reforzar la planta creando muchas proteínas dentro de ella, eliminando el alimento de las plagas al no dejar crear aminoácidos por estrés, es un caldo caliente.

4. *Súper fertilizante, súper fungicida y súper insecticida*

Es un producto insecticida orgánico caliente; el cual está integrado por los siguientes insumos y materiales:

- 70 litros de agua
- 6 kg de cal viva
- 6 kg de azufre
- 8 kg harina de roca o arena de río cernida
- 8 kg de ceniza de fogón
- 5 kg de sal de mar
- Un tambo de metal con capacidad de 100 litros
- Leña y lumbre

Preparación

Meter uno a uno de cada ingrediente con el agua caliente y moverlo al sentido de las manecillas del reloj; una vez que hierva el agua con todos los productos dentro de la hoyo, se deberá dejar que hierva por cinco minutos más, y una vez que se haya enfriado deberá colarlo y listo para su Aplicación. Es necesario mencionar que este producto puede ser almacenado por más de 6 meses después de su elaboración (Vélex, 2002)

Nutrientes que aporta

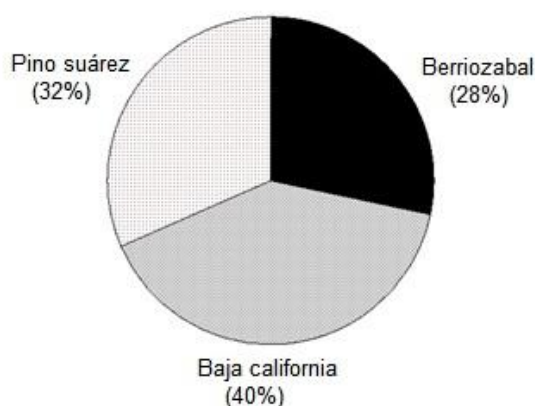
Calcio, azufre, 94 minerales que aporta la harina de roca, fosforo, magnesio, potasio, silicio y 74 minerales diferentes que trae la sal de mar.

Aplicación

De la mezcla obtenida diluir a razón de 1.0 litro del caldo lleva todo en 200 litros de agua y asperjarlo al follaje del cultivo de frijol. Cuando se tiene sistema de riego por goteo o micro aspersión la dosis de es 2 litros diluidos en 1000 litros de agua.

RESULTADOS

El total de productores que asistieron a los cursos son 92, de los cuales el 28% pertenece al municipio de Berriozabal, el 41 % a Baja California y el 31 % a Pino Suárez de Jiquipilas (Figura 1). Del total de los participantes el 17% son hombres y 83% son mujeres. De población total el 11% son empleados, el 11% son comerciantes, el 22% se dedican a la agricultura y el 57% al hogar, las personas que se dedican al hogar presentaron mayor interés esto puede ser porque esta actividad les permite realizar otras actividades diferentes a las cotidianas (Cuadro 1 y 2).



Localidades del municipio de Jiquipilas y Berriozabal, Chiapas

Figura 1. Localidades capacitadas sobre horticultura de traspatio.

Cuadro 1. Individuos que asistieron a la capacitación.

Genero	Porcentaje (%)	Variable	Porcentaje (%)
Hombres	17	Adoptaron la tecnología	41
Mujeres	83	Recibieron la capacitación	59

Cuadro 2. Ocupación de los individuos que asistieron a la capacitación de horticultura de traspatio.

Variable	Hogar (%)	Agricultor (%)	Comerciante (%)	Empleado (%)
Hombre	13	63	6	19
Mujer	66	13	12	9
Productores capacitados	57	22	11	11

De los cursos impartidos en Berriozabal, Baja California y Pino Suárez de Jiquipilas, el 59% asistieron al taller producción de hortalizas de traspatio, el 24 % al taller elaboración de abonos orgánicos y el 17% al taller manejo integral de plagas y enfermedades, por lo tanto estas personas que asistieron

a las capacitaciones tuvieron un interés particular por conocer las técnicas agronómicas para implementarlo en su solar (Figura 2). Del total de los participantes el 41% adoptaron la tecnología y el 59% solamente asistió a los cursos (Figura 3). Con respecto a Berrizobal el 17 % adoptó la tecnología, y del municipio de Jiquipilas el 24% de los productores de Baja California adoptó la tecnología y el 17% de los productores en Pino Suarez estableció hortalizas en el traspatio (Figura 4). Por municipio el 40% del total de los productores de Jiquipilas establecieron hortalizas en el traspatio y en Berriozabal solo el 17% de los productores; en Jiquipilas por ser un municipio que se dedica a la producción de gramíneas fue muy interesante para ellos conocer las propiedades y bondades de otros cultivos.

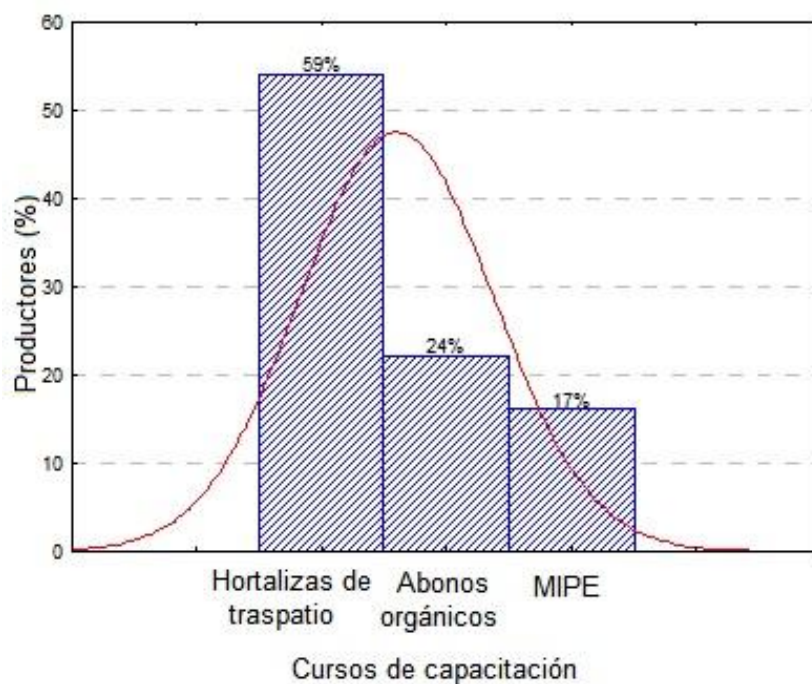


Figura 2. Cursos impartidos y población que asistieron a los cursos.

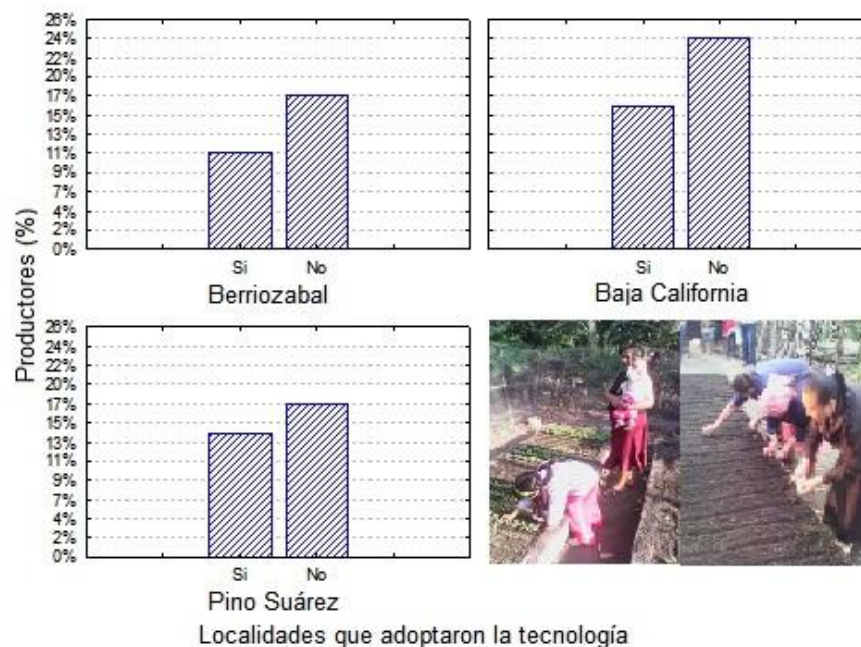


Figura 3. Productores que adoptaron la tecnología de horticultura de traspatio en las diferentes localidades.

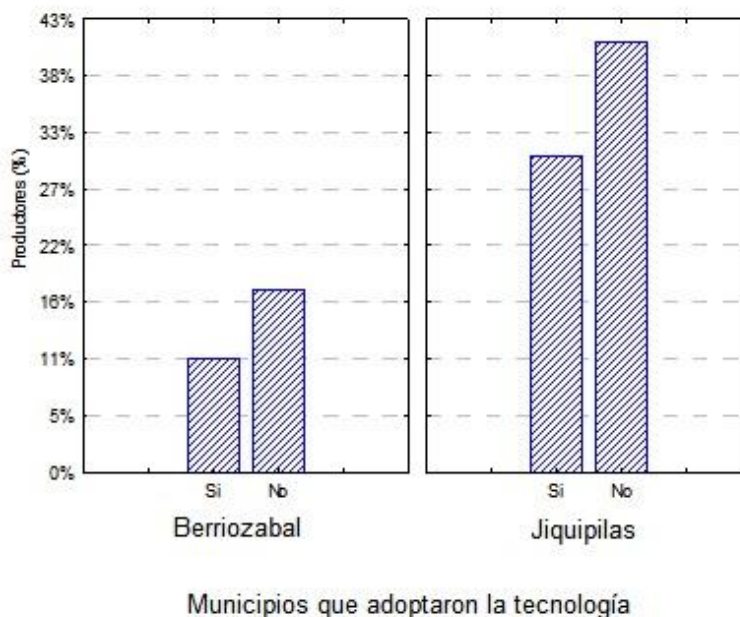


Figura 4. Productores que adoptaron la tecnología de horticultura de traspatio en los municipios de Berriozabal y Jiquipilas, Chiapas.

El establecimiento de hortalizas en el traspatio, permite diversificar la dieta de la población rural, de los municipios de Chiapas, debido a que la mayoría de los pobladores consume frijol y los derivados del maíz. Contar con hortalizas en el patio les permite incrementar sus recursos financieros como generadores de sus propios alimentos, al cosechar hortalizas para la alimentación básica y generar vegetales producidos orgánicamente (García *et al.*, 2009). Esto no solo permite tener alimentos básicos, la mayoría de la mujeres que se dedica al hogar, tiene árboles frutales, plantas medicinales

y de ornato, que intercambian, venden o regalan, y que son de importancia culinaria local, esto está determinado por la adaptación cultural donde las mujeres por su necesidad y preferencias, seleccionan, determinan y conservan en el patio. Además les permite reafirmar el conocimiento que han recibido de sus madres y abuelas (Rodríguez *et al.*, 2011). Una de las limitantes de la adopción de tecnología de horticultura de traspatio, es por la falta de conocimiento, además que los productores no cuentan con conceptos básicos de agroecología, las capacitaciones realizadas permitié, el desarrollo de sus capacidades intelectuales que impactan sobre la seguridad alimentaria y soberanía alimentaria (Duche *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Existe una buena respuesta por parte de los productores de la zona en estudio (mujeres y hombres), a la capacitación de las hortalizas de traspatio, y reconocen la importancia de producir hortalizas de buena calidad para mejorar las condiciones de alimentación.

El 41% de los productores capacitados, establecieron hortalizas de consumo básico en sus solares y algunos de ellos hasta tuvieron ingresos extras por la venta de hortalizas producidas en el solar. Esta actividad puede ser una buena opción para realizar un cambio de conciencia en el consumo de alimentos agrícolas y buscar consumir alimentos sanos e inocuos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Calderón C., L. Soto P. Transformaciones agrícolas en el contexto periurbano de la ciudad de San Cristobal de las Casas, Chiapas. *Revista Limina R. Estudios Sociales y Humanísticos*, 7(1), 2013, pp.125-143.
2. Gros., Domínguez, A. Vivancos. *Abonos Guía práctica de la fertilización*. 8ª Edición revisada y ampliada. Madrid: Mundi-prensa. 1992.
3. E. García P., V. Bezares S., A. Caballero R., J. De la Torre, D. la T., A. Gómez T., 2009. Aprovechamiento del traspatio de hogares de comunidades marginadas del estado de Chiapas, México. *Revista Avances en Seguridad Alimentaria y Nutricional*. Vol. 1 (1), 2009, pp.15-20.
4. F. Ruiz F. *Agricultura orgánica: una opción sustentable para el agro mexicano*. Coloquio UACH. 1986.
5. G. Rodríguez G., R. Perezgrovas G., L. Zaragoza M., 2011. El traspatio como espacio de empoderamiento para la mujer Tzotzil en Chiapas (México). *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* (1), 2011, pp. 280-283
6. INFOAM. *Organic Agriculture worldwide: statistic and future prospects*, en Infoam, Durkhein, Alemania. 2000, p. 53.
7. J. L. López G., M. A. Damian H., F. Álvares G., G. P. Zuluaga S., F. Parra I., J. A. Paredes S. El traspatio de los productores de Maíz: En San Nicolás de los Ranchos, Puebla-México. *Ra Ximhai* Vol. 9 (2), 2013, pp. 181-198.
8. J. Restrepo. *Abonos orgánicos fermentados. Experiencias de Agricultores de Centroamérica y Brasil*. OIT, PSST-AcyP; CEDECE. 1996, p. 51.
9. L. Vélex. *Comparación de la calidad de bokashis elaborados con desechos de fincas del Trópico Húmedo de Costa Rica*. Proyecto de Graduación. Licenciatura Ingeniero Agrónomo. Universidad EARTH. Guácimo, CR. 2002., 35 p.
10. M. A. Toral J., A. L. Del Angel P., J. C. López C., F. Gallardo L., Hábitos alimenticios, diversidad alimentaria y disposición para practicar la horticultura en familias peri-urbanas de la ciudad cardel, Veracruz, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Vol 15 (2), 2012, pp, 135-144.
11. M. Cerrato E., H. Leblanc A., C. Kameko. 2007. Potencial de mineralización de nitrógeno de bocashi, compost y lombricompost producidos en la Universidad EARTH. Costa Rica. *Tierra Tropical* 3 (2), 2007, pp. 183-197.
12. M. P. Yuste P., *Suelos abonos y materia orgánica*. Biblioteca de la agricultura. Barcelona, España. 1998. 768 p.

- 13.M. Rodríguez, y G. Paniagua. Horticultura orgánica: Una guía basada en la experiencia en Laguna de Alfaró Ruiz, Costa Rica. Fundación Guilombe, San José Costa Rica, Serie No.1, Vol. 2,1994, 7 p.
- 14.P. Vandevivere., C. Ramírez. Control de calidad de abonos orgánicos por medio de bioensayos. Memoria Simposio Centroamericano sobre Agricultura Orgánica. San José, CR. 1995, pp. 121-140.
- 15.Queitsch y Jurguen. Esencia de la agricultura ecológica. En boletín sobre agricultura ecológica. No. 1. DICEA, UACH. México, 2002.
- 16.T. Higa and J. Parr. Beneficial and effective microorganisms a sustainable agriculture and environments. International nature farming. Research center. Atami Japan. 1995.
- 17.T. T. Duche G., H. Bernal M., I. Ocampo F., D. Juárez R., A. Villarreal E. B. Agricultura de traspatio y agroecología en el proyecto estratégico de seguridad alimentaria (PESA-FAO) del estado de Puebla. Agricultura sociedad y desarrollo, 14 (2), 2017, pp. 263-281.

POTENCIAL ALELOPÁTICO DE IPOMOEA PURPUREA (L.) ROTH EN LA GERMINACIÓN Y LONGITUD RADICAL DE SEMILLAS DE FRIJOL (PHASEOLUS VULGARIS L.)

Paulina Janneth Pérez Peralta¹, Ronald Ferrera Cerrato¹, Alejandro Alarcón¹ y María del Rocío Cruz Ortega²

¹Colegio de Postgraduados, ²Instituto de Ecología, UNAM.

RESUMEN

La Alelopatía se considera como una interferencia química en la cual la planta u organismo libera compuestos químicos que ejercen un efecto en otras plantas asociadas. La fuente de los compuestos alelopáticos puede proceder de hojas, tallos, flores, entre otros y su liberación es diversa, siendo una de las principales vías a través de la lixiviación o lavado de las partes aéreas de la planta. No obstante, poco se conoce del potencial alelopático de las plantas en la germinación de semillas como las leguminosas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial alelopático de los lixiviados acuosos de Ipomoea en la germinación y la longitud radical de semillas de frijol. Las semillas de frijol (flor de mayo) se germinaron en cajas de Petri con una mezcla de agar al 2% y cada uno de los lixiviados acuosos elaborados a partir de la parte aérea y la raíz de plantas de Ipomoea. Las semillas fueron incubadas a 28°C en total oscuridad. A las 24 y 48 horas se realizó el conteo de semillas germinadas y la medición de la emergencia radicular. Tanto el lixiviado acuoso de la raíz como de la parte aérea de Ipomoea estimularon el porcentaje de germinación de las semillas de frijol a las 48 horas. En tanto que la longitud radical fue beneficiada por el lixiviado acuoso de la parte aérea de Ipomoea a las 24 horas. Se concluyó que la germinación así como la longitud radical de las semillas de frijol pueden ser beneficiadas por los lixiviados acuosos de Ipomoea como planta donadora de compuestos potencialmente alelopáticos, sin embargo, se necesita mayor investigación acerca de los efectos positivos o negativos que producen las plantas alelopáticas.

INTRODUCCIÓN

La alelopatía es un fenómeno biológico característico de algunas plantas, algas, bacterias, corales y hongos, mediante el cual se producen y se liberan al medio sustancias bioquímicas que influyen en el crecimiento y el desarrollo de otros organismos (Narwal, 2010). La alelopatía funciona como una interferencia química en la cual la planta u organismo productor libera compuestos químicos (metabolitos secundarios), los cuales afectan el crecimiento, la supervivencia y la reproducción de otros organismos. La fuente de los compuestos alelopáticos en las plantas puede proceder de hojas, tallos, flores, entre otros e influyen de diferentes maneras (Gruntman et al., 2015; Jabran et al., 2013; Li et al., 2007), por ejemplo, influyen en los procesos fisiológicos de las especies receptoras, inhibiendo o estimulando la tasa de germinación y el crecimiento de plántulas (Hussain et al., 2008; Lorenzo et al., 2008). Sin embargo, es poco lo que se conoce del potencial alelopático de plantas como *Ipomoea purpurea* en la germinación de semillas de leguminosas.

TEORÍA

La capacidad de diversas plantas para inducir efectos alelopáticos en la vegetación que les rodea, ha sido documentada desde tiempos remotos. El registro alelopático más antiguo fue reportado por Teofrasto (300 a. C.), quien detectó el efecto perjudicial de la col (*Brassica* L.) en el crecimiento de la vid (*Vitis* L.) y propuso que estos efectos eran producidos por los “olores” de las plantas de col (Zohaib et al., 2016). En México, *I. purpurea* es una maleza común y ampliamente distribuida que genera efectos negativos en cultivos de ajonjolí, calabaza, avena, algodón, caña, chile, café, frijol, tomate, mango, entre otros (CONABIO, 2016b). Urzúa-Soria et al. (2002) reportan la incidencia de *I. purpurea* en la rotación de cultivo maíz-trigo; en cultivos de pimiento morrón (Schutte y Cunningham 2015), café o algodón (Arias-Ortiz, et al., 2011). Algunos compuestos químicos reportados en *I. purpurea* son exclusivos, tal es el caso de los alcaloides ergolínicos, entre los cuales destacan la ergina, isoergina, ácido lisérgico, ergosina y ergosinina, los cuales son tóxicos para el ser humano. No obstante, los extractos de plantas de la misma familia que Ipomoea (convolvuláceas) pueden ser exitosos en el control de hongos fitopatógenos (Mahmoud et al., 2004).

PARTE EXPERIMENTAL

La preparación de lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* consistió en colocar en un matraz Erlenmeyer 20 g por separado de la parte aérea (tallos y hojas) y raíz fresca de *Ipomoea*. Se adicionaron 100 mL de agua destilada estéril y se dejó reposar durante 3 h para extraer los compuestos hidrosolubles y se agitó vigorosamente cada 60 min. La solución resultante (20%) se filtró con papel Whatman no. 4 y posteriormente fue filtrada a través de una membrana Milipore de 0.22 μm Millex®-GS para obtener un lixiviado estéril. Posteriormente, las semillas de frijol (flor de mayo) se germinaron en cajas Petri con una mezcla de agar al 2% y los lixiviados acuosos de *I. purpurea* al 8, 16 y 30% para obtener una concentración final de 4, 8 y 15%. Como grupo control se mezclaron 10 mL de agua destilada estéril y 10 mL de agar al 2%. Una vez solidificado el agar, se colocaron 36 semillas por tratamiento. Cada una de las cajas fue sellada con Parafilm y colocadas en un incubadora a 28°C en total oscuridad. Se llevó a cabo el conteo de semillas germinadas, así como la medición de la emergencia radicular a las 24 y 48 h. El diseño experimental fue completamente al azar, cada unidad experimental constó de 12 semillas con tres repeticiones para cada concentración de los lixiviados. Los datos se sometieron a un análisis de varianza con la posterior prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$), en el programa SAS versión 9.4.

RESULTADOS

La aplicación del lixiviado acuoso de la raíz de *Ipomoea* a las 24 h, no tuvo efecto significativo en la germinación de las semillas de frijol (Figura 1A). Sin embargo, después de 48 h, la estimulación en la germinación fue significativa, en particular con la aplicación de dicho lixiviado al 15% (Figura 1A). En el caso de la aplicación del lixiviado de la parte aérea de *Ipomoea*, a las 24 h, la aplicación de 4% de lixiviado produjo una estimulación en la germinación, sin ser estadísticamente diferente al testigo; mientras que, a las 48 h todas las concentraciones del lixiviado estimularon significativamente la germinación con respecto al control, sobresaliendo la concentración de 4% (Figura 1B).

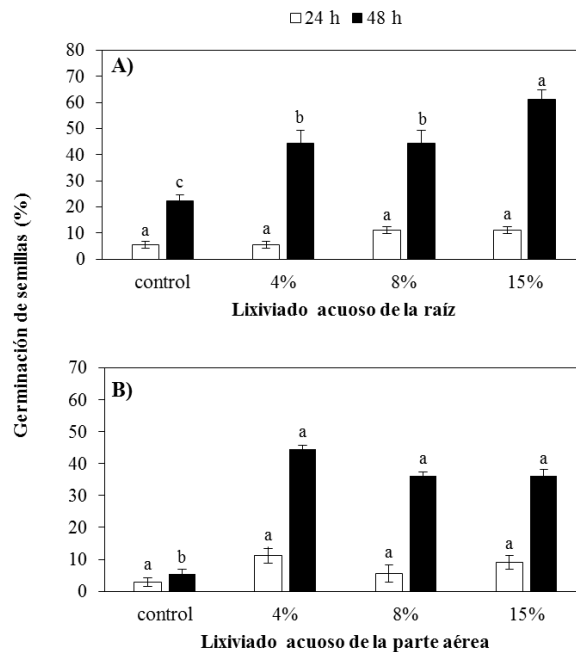


Figura 1. Porcentaje de germinación de las semillas de frijol expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de parte aérea (B) de *Ipomoea purpurea* a las 24 y 48 h. Medias \pm error estándar con letras distintas en cada tiempo de muestreo, en cada subfigura indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

En cuanto a la longitud radical del frijol, en general, se observó una relación positiva entre la longitud radical de las plántulas de frijol y la concentración del lixiviado de la raíz; sin embargo, no existió diferencia significativa entre tratamientos en los dos tiempos de evaluación (Figura 2A). Se observó que al 4 y 15%, el lixiviado acuoso de la parte aérea, produjo un aumento significativo en la longitud radical de las plántulas de frijol después de 24 h (Figura 2B). No obstante, a las 48 h no se detectaron diferencias en las concentraciones de dicho lixiviado (Figura 2B).

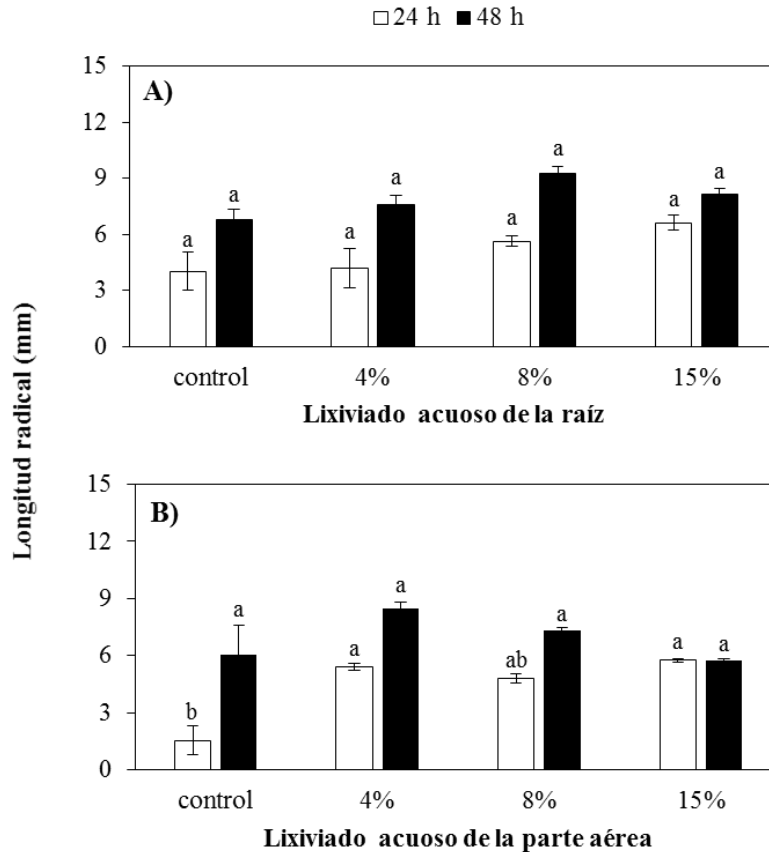


Figura 2. Longitud radical (mm) de las plántulas de frijol expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de la parte aérea (B) de *Ipomoea purpurea* a las 24 y 48 h. Medias \pm error estándar con letras distintas en cada tiempo de muestreo, en cada subfigura indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

CONCLUSIONES

El lixiviado acuoso de la parte aérea de *Ipomoea purpurea* causó un efecto estimulante en la germinación y longitud radical del frijol a las 24 h, por lo cual, los lixiviados acuosos de raíz y de la parte aérea de *I. purpurea* representan una opción efectiva en la germinación de semillas de frijol. Sin embargo, los resultados de éste trabajo resaltan la importancia de llevar a cabo más estudios que nutran y corroboren los efectos de plantas con potencial alelopático en la germinación de semillas.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Zohaib, T. Abbas y T. Tabassum, "Weeds cause losses in field crops through Allelopathy", *Notulae Scientia Biologicae*, Vol. 8,1, 2016, pp. 47-56.

2. B. J. Schutte y A. Cunningham, "Tall Morningglory (*Ipomoea urpurea*) Seedbank Density Effects on Pedimethalin Control Outcomes", *Weed Science Society of America*, Vol. 29,4, 2015, pp. 844-853.
3. CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/convulvaceae/ipomoea-purpurea/fichas/ficha.htm>. Fecha de consulta 3 de enero 2016.
4. F. Urzua-Soria, J. Kohashi Shibata, B. Figueroa Sandoval y A. Martínez Garza, "Dinámica poblacional de malezas en diferentes sistemas de labranza y métodos de control en la rotación trigo-maíz", *Agricultura Técnica en México*, Vol. 28, 29, 2002, pp. 105-123.
5. H.M Arias-Ortiz, A. López, V. Bernal y E. Castaño. "Caracterización ecológica y Fitoquímica de la batatilla *Ipomoea Purpurea* L. Roth (Solanales, Convolvulaceae) en el municipio de Manizales", *Boletín Científico Museo Historia Natural*, Vol. 15,2, 2011, pp. 19-39.
6. L. Li, S. M. Li, J. H. Sun, L. L. Zhou, X. G. Bao, H. G. Zhang, y F. S. Zhang, "Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 104, 2007, pp. 11192-11196.
7. M. Gruntman, S. Zieger y K. Tielbörger. "Invasive success and the evolution of enhanced weaponry", *Oikos*, Vol. 125, 2015, pp. 59-65.
8. M. I. Hussain, L. González y M. J. Reigosa. "Germination and growth response of four plant species towards different allelochemicals and herbicides", *Allelopathy Journal*, Vol. 22,1, 2008, pp. 101-110.
9. M. Jabran, M. Farooq, T. Aziz y K. H. M. Siddique. "Allelopathy and crop nutrition," in *Allelopathy. Current Trends and Future Applications* (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013), Chapter 14, pp. 337-348.
10. P. Lorenzo, E. Pazos-Malvido, L. González y M. J. Reigosa, "Allelopathic interference of invasive *Acacia dealbata*: physiological effects", *Allelopathy Journal*, Vol. 22,2, 2008, pp. 64-76.
11. S. S. Narwal, "Allelopathy in ecological sustainable organic agriculture", *Allelopathy Journal*, Vol. 25, 2010, pp. 1-72.
12. Y. A. G. Mahmoud, M. K. H. Ebrahim y M. M. Aly, "Influence of some plant extracts and microbioagents on some physiological traits of faba bean infected with *Botrytis fabae*", *Turkish Journal of Botany*, Vol. 28, 2004, pp. 519-528.
13. A. G. Evans, "Perspectiva on the development of high-toughness ceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 73, 2, 1990, pp. 187-206.
14. T. Kreis, "Speckle Metrology," in *Holographic Interferometry* (Akademie Verlag Inc., New York, NY, 1996), Chapter 4, pp. 125-149.

CAMBIOS EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL Y EFECTO DEL SEXO EN CONEJOS ADICIONADOS CON OMEGA-3

Berenice Sánchez Mendoza, Germán Buendía Rodríguez.

INIFAP-CENID FyMA. sanchez.berenice@inifap.gob.mx

RESUMEN

La carne de conejo puede ofrecerse al mercado como un producto comercial con un contenido de grasa menor al 9%. Los ácidos saturados y los monoinsaturados constituyen la parte principal de los ácidos grasos de los triglicéridos de la grasa de la carne, una ventaja que presenta el consumo de carne de conejo es su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los cuales son considerados favorables para la salud. El objetivo fue evaluar los cambios en las características de la canal en conejos alimentados con omega-3. Se utilizaron 12 conejos (6 machos y 6 hembras) con un peso vivo promedio de 1.5 kg distribuidos en dos tratamientos, de dos bloques cada uno. Se evaluó la capacidad de retención de agua (CRA), color (Colorímetro Hunter), temperatura de la canal caliente y fría, terneza mediante resistencia al corte (Warner- Bratzler en un analizador de textura TA- XT2 (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY). El omega-3 mejoro algunos (L, b) parámetros de color, tanto en la canal caliente como fría. La canal caliente, en el musculo *Longissimus dorsi*, presento una mejor terneza en los animales suplementados con omega-3, sin embargo, la canal fría únicamente mejoro en el caso de las hembras. Los conejos sin suplementar presentaron mayor retención de agua en el *biceps femoris*. La adición de omega-3 mejoro algunos parámetros en la composición de la canal, sin embargo, se necesita una investigación más amplia para obtener resultados más concretos.

INTRODUCCION

La carne de conejo se clasifica como un alimento bajo en colesterol y con un alto contenido de ácidos grasos (Lin y Connor, 1990). La inclusión de ácidos grasos poliinsaturados presenta en gran medida efectos sobre las propiedades físico- químicas y la calidad organoléptica de la carne (Leskanich, et al., 1997). Existen diferencias entre el sexo y la composición de la canal en cuanto a madurez, infiltración de grasa, retención de agua y el nivel de proteína (Friesien, et al., 1994). Esto se debe a que las hembras depositan mayor contenido de grasa intramuscular en comparación con los machos (López, et al., 1992). Las dietas adicionadas con ácidos grasos pueden reducir la cantidad de grasa en la canal de los conejos, estabilizar el tejido muscular y modificar la actividad enzimática (Corino et al., 2002). Por tal motivo el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del sexo sobre las características de la canal de conejos suplementados con ω -3 mediante un panel de degustación. El objetivo fue evaluar los cambios en las características de la canal y efecto del sexo en conejos alimentados con omega-3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 conejos (6 machos y 6 hembras) con un peso vivo promedio de 1.5 kg distribuidos en dos tratamientos, de dos bloques cada uno. Todos los animales fueron alojados en jaulas individuales y recibieron un alimento comercial para conejos (PC, 15.50%, Grasa 2%, Fibra 15%, Humedad, 12%, Cenizas 9%, ELN, 46.50%, Calcio 1%, Fósforo 0.55%), con o sin omega-3. (200 mg / kg PV / d según las recomendaciones de Clubb et al., 1989), y agua ad libitum durante 5 semanas. Los conejos fueron sacrificados por la técnica de desnucamiento de acuerdo a la NOM-033-ZOO-1995.

La carne permaneció en un sistema de conservación durante 24 h a una temperatura de 0° C a 4° C (NMX-FF-105-SCFI-2005). Se evaluó la capacidad de retención de agua (CRA), con 10 g de carne y NaCl 0.6 M, centrifugados durante 15 minutos a 10000 rpm (Guerrero, 2002).

Para identificar el color de la canal se utilizaron los valores de la escala del Colorímetro Hunter Lab la cual utiliza tres parámetros, L, a y b, donde L mide las tonalidades de blanco (100) hasta negro (0), a mide las tonalidades de rojo (+) hasta verde (-) y b las de amarillo (+) hasta azul (-) (Trocino et al., 2003).

La toma de temperatura en la canal se llevó a cabo 45 minutos post mortem en la canal caliente, y 24 h después para la canal fría, utilizando un termómetro digital (modelo 102, 1.5 V 0.1 mW) sobre el músculo *longissimus dorsi* (Becerril *et al.*, 2004).

La terneza se midió mediante la técnica de resistencia al corte utilizando la navaja Warner- Bratzler en un analizador de textura TA- XT2 (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY) (Guerrero *et al.*, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El músculo que menos perdió agua en las evaluaciones tanto en canal caliente como en canal fría fue el *Biceps femoris* de los conejos no suplementados (9.87 ml) en el cuadro 1 se muestra que el músculo *Longissimus dorsi* de los conejos suplementados con omega-3 tuvo una tendencia a perder más agua en comparación a los demás tratamientos (13.04ml).

Cuadro 1. Capacidad de retención de agua (ml).

Musculo	Machos	Hembras
<i>Biceps femoris</i> sin omega-3	9.87	10.16
<i>Longissimus dorsi</i> sin omega -3	13.04	11.37
<i>Biceps femoris</i> con omega -3	11.20	11.00
<i>Longissimus dorsi</i> con omega -3	11.70	13.08

En el cuadro 2 se presentan los promedios obtenidos con el colorímetro para las variables, claridad (L), intensidad de rojo (a) e intensidad de amarillo (b), en la canal caliente, en donde los valores de (L) para los machos control fueron más claros en comparación con los machos con omega-3, (43.24 y 50.14, respectivamente) en el caso de las hembras control presentaron un color más claro que las hembras suplementadas (45.74 y 48.42 respectivamente), para el valor de (a) las hembras con omega-3 tendieron a ser más rojas que las hembras control (3.18 y 3.02 respectivamente) en el caso de los machos fueron menos rojos que las hembras (2.51 y 2.33 respectivamente) y los valores de (b) para las hembras con omega-3 presentaron una coloración más amarilla que las hembras control (11.82 y 9.18 respectivamente), de igual forma los machos con omega-3 presentaron una coloración más amarilla que los machos control (11.07 y 10.01 respectivamente).

Cuadro 2. Resultados de color en canal caliente y fría.

Variable	Canal caliente				Canal fría			
	MS	MC	HS	HC	MS	MC	HS	HC
L	50.14	43.24	48.42	45.74	50.19	49.42	51.34	49.12
a	2.51	2.33	3.18	3.02	3.95	3.35	4.17	3.45
b	11.07	10.01	11.82	9.18	10.76	10.49	9.71	7.99

L = Media de los valores obtenidos en el colorímetro, con respecto al rango de color de blanco a negro.

a = Media de los valores obtenidos en el colorímetro, con respecto al rango de color de rojo a azul.

b = Media de los valores obtenidos en el colorímetro, con respecto al rango de color de amarillo a verde.

MS = Machos suplementados con omega; MC = Machos grupo control; HS = Hembras suplementados con omega; HC = Hembras grupo control.

En el cuadro 3 se puede observar que la textura del lomo presenta mayor suavidad en los cortes realizados en machos suplementados con omega-3 en comparación a los machos del grupo control (958.76 g y 1117.4 g, respectivamente). Mientras que, para las hembras, los resultados fueron similares (1107.73 g y 1718.54 g, para con omega-3 y control respectivamente). En cuanto a la textura de la pierna, los cortes obtenidos de la canal de los machos del grupo con omega-3, también presentaban mayor suavidad, en comparación a los del grupo control.

Cuadro 3. Textura

Corte	Canal caliente				Canal fría			
	MS	MC	HS	HC	MS	MC	HS	HC
<i>Longissimus dorsi</i>	958.76	1117.4	1107.73	1718.54	852.62	430.45	410.13	558.35
<i>Biceps femoris</i>	1435.72	2208.11	1174.71	1852.03	1195.65	870.42	1086.47	1095.23

MS = Machos suplementados con omega-3; MC = Machos grupo control; HS = Hembras suplementadas con omega; HC = Hembras grupo control.

En cuanto a la textura para el lomo de las canales del grupo control, presentan mayor suavidad en comparación a las canales suplementadas (430.45 g y 852.62 g, respectivamente). En cuanto a las hembras fue lo contrario, ya que las canales de las hembras del grupo suplementado presentaron mayor suavidad que el grupo control (410.13 g y 558.35 g, respectivamente).

CONCLUSIONES

El omega-3 mejora la textura y color de la carne, dicho efecto fue más notorio en machos en el caso de la canal caliente, sin embargo en el caso de la canal fría el efecto fue mayor para las hembras. La importancia de la suplementación en animales con omega-3 radica en el interés por investigar nuevas áreas relacionadas con una mejora en la calidad de la carne, y la importancia en la utilización de ácidos grasos poliinsaturados.

LITERATURA CITADA

1. Becerril, H. M. 2004. Crecimiento y Calidad de la Canal de Cerdos Pelón Mexicano y York-Landrace en Confinamiento y Pastoreo. Tesis que para obtener el grado de maestría en biología de la producción agropecuaria. UAN Facultad de MVZ. Pag. 50.
2. Corino, C., Mourot, J. Magni, S., Pastorelli, G. y Rosi, F. 2002. Influence of dietary conjugated linoleic acid on growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. *J. Anim. Sci.* 80:1020–1028.
3. Clubb, F.J., Schmitz, J.M., Butler, M.M., Buja, L.M., Willerson JT y Campbell WB. 1989. Effect of dietary omega-3 fatty acid on serum lipids, platelet function, and atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Anim. Sci.* 69 (4):529-537.
4. Friesen, K.G., Nelssen, J.L., Unruh, J.K., Goodband, R.D. and Tokach, M.D. 1994. Effects of the Interrelationship Between Genotype, Sex, and Dietary Lysine on Growth Performance and Carcass Composition in Finishing Pigs Fed to Either 104 or 127 Kilograms. *Journal of Animal Science*:72: 946-954.
5. Guerrero, L. I; Ponce, A. E; Pérez, C. Ma. De L. 2002. Curso práctico de tecnología de carnes y pescado. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
6. Leskanich, C.O., Matthews, K.R., Warkup, C.C., Noble, R.C. y Hazzledine, M. 1997. The effect of dietary oil containing (n-3) fatty acids on the fatty acid, physicochemical, and organoleptic characteristics of pig meat and fat. *J. Anim. Sci.* 75:673-683.
7. Lin, D.S. y Connor, W.E. 1990. Are then n-3 fatty acids from dietary fish oil deposited in the triglyceride stores of adipose tissue? *American Journal of Clinical Nutrition*: 51: 535 – 539.
8. López, M.C., Sierra, I. y Lite, M.J. 1992. Carcass quality in Gigante de España purebred and commercial cross-bred 1 rabbits. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires - 17: 75-80.*
9. Norma Oficial Mexicana. NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio Humanitario de los animales domésticos y silvestres.
10. Norma Oficial Mexicana. NMX-FF-105-SCFI-2005. Productos pecuarios-carne de conejo en canal - calidad de la carne- clasificación.
11. Trocino A., Xiccato G., Queaque P.I., Sartori A. 2003. Effect of transport duration and gender on rabbit carcass and meat quality. *World Rabbit Science.* 11(1):23-32.

CAMBIOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA FRESCA DE CAÑA DE AZÚCAR CRECIDAS EN TRES RELACIONES MACRONUTRIMENTALES

Senties-Herrera, H.E.¹; Gómez-Merino, F.C.¹; Trejo-Téllez, L.I.¹; Cadena-Iñiguez, J.²; Sánchez-García, P.¹; Volke-Haller, V.H.¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. ²Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. Calle de Iturbide 73, San Agustín, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. C. P. 78622.
correo-e: hector.senties@colpos.mx

RESUMEN

El suministro correcto de nutrimentos a través de la solución nutritiva puede influir significativamente en el crecimiento y desarrollo de plántulas de caña de azúcar. El presente estudio evaluó tres relaciones macronutrientales con el aumento y decremento de un 25% de los nutrimentos N, P, K y Mg, tomando como referencia la solución de Steiner, considerada como 100%; por tanto, las RM consideradas fueron 75, 100 y 125%. La variable respuesta fue la producción de biomasa fresca (BF) de tallos, vainas y hojas de plántulas de caña de azúcar var. CP 72-2086 en tres intervalos de tiempo (30, 60 y 90 días después del trasplante -ddt). Los resultados indican que los tratamientos no afectaron la biomasa fresca a los 30 ddt. A los 60 y 90 ddt, la mayor producción de BF se obtuvo con las RM 100 y 125%, respectivamente. Las vainas no mostraron diferencias significativas en biomasa por efecto de las RM a los 30 ddt, aunque la mayor producción de BF de este órgano se obtuvo con la RM 125% a los 90 ddt. Respecto a las hojas, su producción de BF no mostró efecto de los tratamientos a los 30 y 90 ddt, pero a los 60 ddt, ésta se incrementó por efecto de la RM 100% de manera significativa. En conclusión, el manejo de RM con diferentes concentraciones de N, P, K y Mg, para la producción de BF de tallos, vainas y hojas de las vitroplántulas de caña de azúcar es como sigue: la RM 75% para los 30 ddt, la RM 100% para los 60 ddt y la RM 125% para los 90 ddt.

INTRODUCCIÓN

El suministro correcto de nutrimentos a través de la solución nutritiva puede influir significativamente en el crecimiento y desarrollo de plántulas de caña de azúcar. Durante el proceso de acumulación de biomasa fresca, la planta tiene la capacidad de sintetizar su propia biomasa a partir de los elementos y compuestos que provee el medio de crecimiento, en presencia de agua como medio de acceso de nutrimentos y luz solar para llevar a cabo la fotosíntesis (Martínez-Romero y Leyva-Galán, 2014). Por tanto, el manejo balanceado de nutrimentos es esencial para alcanzar altos rendimientos y mejorar la eficiencia en su uso, lo que beneficia por igual a los agricultores, a la sociedad y al ambiente (Cabrera y Zuaznábar, 2010). Existe la evidencia derivada de varios estudios conducidos en distintas partes del mundo, que entre el 30 y 50 % del rendimiento de los cultivos es atribuible a los nutrimentos aplicados (Stewart *et al.*, 2005). Por ello, sistemas tecnificados de irrigación y fertirrigación, han mostrado una respuesta positiva para lograr altos rendimientos para distintos materiales genéticos de caña de azúcar (Gava *et al.*, 2011). Lo anterior, es una alternativa que da la oportunidad para crear programas de manejo de la nutrición del cultivo en cuestión, que permitan una mayor eficiencia en el uso de agua y nutrimentos (Thorburn *et al.*, 2003). El establecimiento de relaciones macronutrientales adecuadas, por cada etapa fenológica, es determinante en la productividad final del cultivo. Con base en lo anterior, en el presente estudio se evaluaron tres relaciones macronutrientales con el aumento y decremento de un 25% de los nutrimentos N, P, K y Mg, tomando como referencia la solución de Steiner, considerada como 100%; por tanto, las RM consideradas fueron 75, 100 y 125%, y como variable respuesta se consideró el peso de la biomasa fresca durante 90 días de crecimiento de plantas de caña de azúcar var. CP 72-2086.

PARTE EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó en condiciones de invernadero en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, cuyas coordenadas geográficas son 19° 28' 05" latitud norte y 98° 54' 09" longitud oeste, a una altitud de 2,220 m. EL periodo de duración del experimento fue de mayo a septiembre de 2016. El material vegetal utilizado, corresponde a vitroplantas de caña de azúcar var.

CP 72-2086 provenientes de la Biofábrica Vitromotz. La plantación se realizó en bolsas para vivero de 25 x 25 cm con tezontle rojo (granulometría de 2 a 5 mm). La unidad experimental fue una bolsa con una vitroplanta. Después del trasplante, las plántulas fueron regadas nueve veces al día (7:00, 9:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 17:00 y 18:00 h) con las diferentes soluciones modificadas a partir de la solución universal Steiner (Steiner, 1984). El pH de las soluciones fue ajustado a 5.5 con ácido sulfúrico concentrado. Las soluciones nutritivas fueron preparadas con fertilizantes de alta pureza.

El diseño de tratamientos fue a partir de la solución universal de Steiner (Steiner, 1984), para el diseño de las relaciones de macronutrientes. La composición base fue la siguiente: (meq·L⁻¹): 12 NO₃⁻, 1 H₂PO₄⁻, 7 SO₄²⁻, 7 K⁺, 4 Mg²⁺ y 9 Ca²⁺, con un potencial osmótico es de -0.072 MPa. Como fuente de micronutrientes, se utilizó el producto comercial Tradecorp AZ a razón de 0.066 g L⁻¹. Se aumentó y se redujo en una misma proporción (25%) los miliequivalentes para los nutrientes siguientes: Nitrato, Fosfato, Potasio y Magnesio. El potencial osmótico de las soluciones nutritivas se ajustó a -0.072 MPa, es decir, una conductividad eléctrica (CE) de 2 dS m⁻¹. El pH se ajustó entre 5.5 y 6 con ácido sulfúrico. Se evaluó la producción de biomasa fresca a los 30, 60 y 90 días después del trasplante (ddt) con la separación de la planta por órganos (tallo, vaina y hojas). Para determinación el peso de la biomasa fresca de cada órgano se utilizó una balanza analítica (Adventurer Pro AV213C, Ohaus; Parsippany, NJ, EEUU). El análisis estadístico de los datos consistió en un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) efectuados con el programa estadístico Statistical Analysis System SAS versión 9.0 (SAS Institute, 1990).

RESULTADOS

Los resultados del análisis de los datos a los 30, 60 y 90 días después del trasplante (ddt) se muestran en las Figuras 1, 2 y 3.

En relación a la biomasa fresca de tallos (BFT) (Figura 1), ésta no muestra diferencia estadística significativa en los 30 ddt, aunque se muestra una ligera tendencia al alza con la RM 75%. Para el siguiente periodo de evaluación (60 ddt), ya se aprecia una diferencia estadística entre las RM, siendo la RM 100% la que mostró una mayor BFT. Sin embargo, la tendencia se modificó a los 90 ddt, a mayor concentración de nutrientes en la relación macronutricional se incrementó la BFT. En la biomasa fresca de hojas (BFH) (Figura 2), se muestra una tendencia a aumentar a los 30 ddt con la RM 75%. Sin embargo, a los 60 y 90 ddt, se presentó una tendencia similar a la producción de BFT. La RM 100% fue la que presentó el mayor incremento a los 60 ddt, y la RM 125% fue la que incrementó a los 90 ddt la BFH.

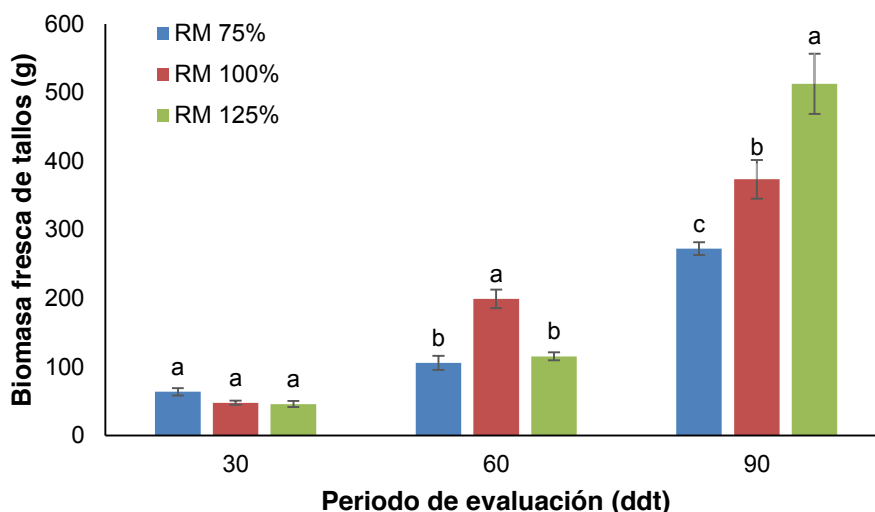


Figura 1. Biomasa fresca de tallos a los 30, 60 y 90 ddt por efecto de tres relaciones macronutrientales (RM). Medias \pm DE con letras distintas en cada periodo de evaluación, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

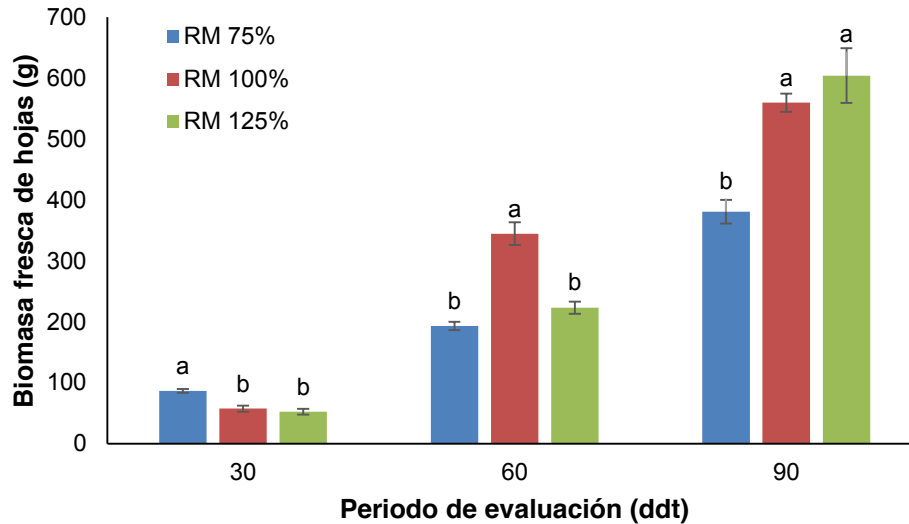


Figura 2. Biomasa fresca de hojas a los 30, 60 y 90 ddt por efecto de tres relaciones macronutrimientales (RM). Medias \pm DE con letras distintas en cada periodo de evaluación, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

La biomasa fresca de vainas (BFV), sigue la misma tendencia a los 60 y 90 ddt que la BFT y BFH, ya que para el primer periodo de evaluación, aun no se presentó este órgano formado para ser cuantificado. Se observa en la Figura 3, que las RM 100% a los 60 ddt y la RM 125% a los 90 ddt, fueron las que incrementaron la BFV.

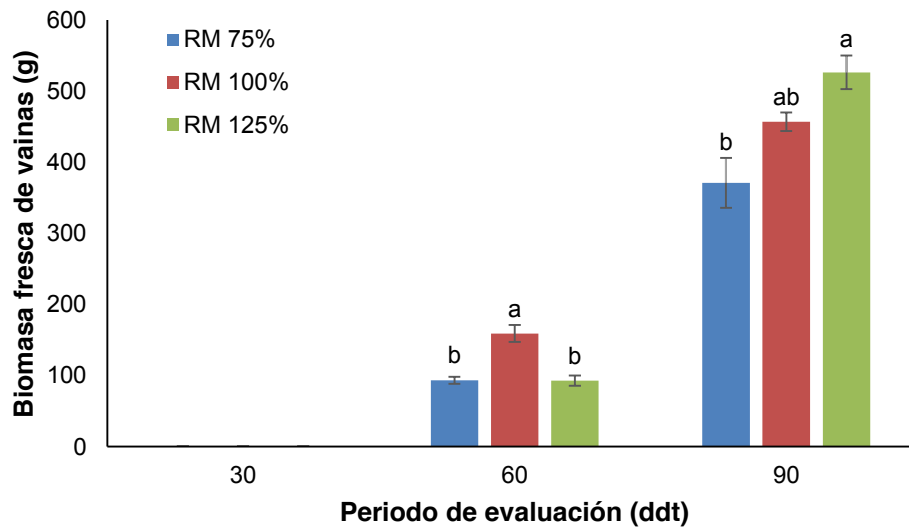


Figura 3. Biomasa fresca de vainas a los 30, 60 y 90 ddt por efecto de tres relaciones macronutrimientales (RM). Medias \pm DE con letras distintas en cada periodo de evaluación, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

De acuerdo con las tendencias observadas en la BFT, BFH y BFV, en cada periodo de evaluación, es evidente que para incrementar la biomasa fresca de cada órgano, y esto traducirlo a un mayor crecimiento y desarrollo de la planta, se puede iniciar con una concentración macronutrimienta baja

(RM 75%) en los primeros 30 ddt, continuar con una concentración media (RM 100%) hasta los 60 ddt. Finalmente aumentar a una concentración alta (RM 125%).

BIBLIOGRAFÍA

1. A. A. Steiner, "The universal nutrient solution. pp. 633-649". *In: Proceedings of Sixth International Congress on Soilless Culture. International Society for Soilless Culture. Lunteren, The Netherlands. 1984.*
2. A. Martínez-Romero, A. Leyva-Galán, "La biomasa de los cultivos en el agroecosistema. Sus beneficios agroecológicos", *Cul. Tro. Vol. 35, 1, 2014, pp. 11-20.*
3. C. J. A. Cabrera, C. R. Zauznábar, "Respuesta de la caña de azúcar a la fertilización nitrogenada en un experimento de Larga Duración con 24 cosechas acumuladas", *Cul. Tro. Vol. 31, 1, 2010, pp. 93-100.*
4. G. J. C. Gava, M. B. Teixeir, P. C. O. Trivelin, M. W. Oliveira, O. T. Kolln, "Drip irrigation in sugar cane crop: management and physiology", *In: C. Bilibio, O. Hensel, J. F. Selbach (eds), Sustainable water management in the tropics and subtropics and case studies in Brazil. Vol 1, 2011, pp. 467-496.*
5. P. J. Thorburn, I. K. Dart, I. J. Biggs, C. P. Baillie, M. A. Smith, B. A. Keating "The fate of nitrogen applied to sugarcane by trickle irrigation", *Irrig. Sci. Vol. 22, 2003, pp. 201-209.*
6. SAS Institute Inc., SAS/STAT Users Guide. Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA), 2011.
7. W. M. Stewart, D. W. Dibb, A. E. Johnston, T. J. Smyt, "The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production", *Agron. J. Vol. 97, 2005. pp. 1-6.*

RELACIONES MACRONUTRIMENTALES DE N, P, K Y MG AFECTAN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE HOJAS DE CAÑA DE AZÚCAR VARIEDAD CP 72-2086

Senties-Herrera, H.E.¹; Gómez-Merino, F.C.¹; Trejo-Téllez, L.I.¹; Cadena-Iñiguez, J.²; Sánchez-García, P.¹; Volke-Haller, V.H.¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. ²Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. Calle de Iturbide 73, San Agustín, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. C. P. 78622.
correo-e: hector.senties@colpos.mx

RESUMEN

Los macronutrientes son esenciales para el óptimo crecimiento y desarrollo de las plantas, y la deficiencia o suficiencias de alguno de ellos pueden ocasionar variaciones fisiológicas importantes. Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el desarrollo de hojas de plántulas de caña de azúcar provenientes de cultivo *in vitro*, durante 30, 60 y 90 días después del trasplante (ddt), sometidas a tres relaciones macronutrientales (RM) con el aumento y decremento de un 25% de los nutrientes N, P, K y Mg respecto a la solución de Steiner tomada como 100% (RM 75, 100 y 125%). Los resultados muestran que a los 30 ddt, se tuvo un promedio de 3 hojas desarrolladas sin importar la RM en las que fueron crecidas las plántulas y con un número de 1 y 2 hojas en desarrollo sin presentar diferencias estadísticas significativas. Para los 60 ddt, se observaron cambios en el número de hojas desarrolladas por efecto de las RM 75 y 100%; mientras que, la RM 125% presentó el valor significativamente más bajo. De igual manera, las hojas en desarrollo fueron muy similares en las plántulas de las tres RM, sin diferencias estadísticas significativas. En el último periodo de evaluación, el número de hojas desarrolladas y en desarrollo por efecto de las tres RM. Sin embargo, para ambos tipos de hojas, la RM 100% produjo los valores más altos. En conclusión, en las primeras etapas de crecimiento y desarrollo de hojas de plántulas de caña de azúcar, no se ve influenciada por un alto, óptimo o bajo suministro de N, P, K y Mg.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento y desarrollo vegetal son procesos de aumento irreversible del tamaño de los organismos, que implica una serie de cambios fisiológicos y reacciones bioquímicas, las cuales son determinantes en el comportamiento agronómico y el rendimiento potencial de los distintos genotipos de plantas. Por lo general, el crecimiento y desarrollo se determinan mediante medidas directas (altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas, área foliar, biomasa seca, etc.) e indirectas como la tasa de asimilación neta, tasa de crecimiento del cultivo, tasa relativa de crecimiento, etc. (Hunt, 1978). Por otra parte, existen factores que son determinantes para crecimiento y desarrollo, como la luz, temperatura, humedad y la nutrición, entre otros (Salisbury y Ross, 1994). Por lo anterior, el crecimiento y desarrollo dan lugar a una serie de cambios estructurales de tamaño, peso y forma específicos, que ocurren de acuerdo con los patrones de división celular y diferenciación, los cuales no pueden considerarse fuera del contexto ambiental, con la interacción de la intercepción de radiación solar y el suministro de agua y nutrientes, se encuentra directamente relacionado con eventos fisiológicos que afectan la producción y acumulación de materia seca entre los diferentes órganos (Rodríguez, 2000). La presente investigación se planteó el objetivo evaluar el desarrollo de hojas de plántulas de caña de azúcar, durante 30, 60 y 90 días después del trasplante (ddt), sometidas a tres relaciones macronutrientales (RM) con el aumento y decremento de un 25% de los nutrientes N, P, K y Mg respecto a la solución de Steiner tomada como 100% (RM 75, 100 y 125%).

PARTE EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó en condiciones de invernadero en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, cuyas coordenadas geográficas son 19° 28' 05" latitud norte y 98° 54' 09" longitud oeste, a una altitud de 2,220 m.

El material vegetal utilizado, corresponde a vitroplantas de caña de azúcar var. CP 72-2086 provenientes de la Biofábrica Vitromotz. La plantación se realizó en bolsas para vivero de 25 x 25 cm con tezontle rojo (granulometría de 2 a 5 mm).

La unidad experimental fue una bolsa con una vitroplanta. Después del trasplante, las plántulas fueron regadas nueve veces al día (7:00, 9:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 17:00 y 18:00 h) con las diferentes soluciones modificadas a partir de la solución universal Steiner (Steiner, 1984). El pH de las soluciones fue ajustado a 5.5 con ácido sulfúrico concentrado. Las soluciones nutritivas fueron preparadas con fertilizantes de alta pureza.

El diseño de tratamientos fue a partir de la solución universal de Steiner (Steiner, 1984), para el diseño de las relaciones de macronutrientes (Cuadro 1). La composición base fue la siguiente: (meq·L⁻¹): 12 NO₃⁻, 1 H₂PO₄⁻, 7 SO₄²⁻, 7 K⁺, 4 Mg²⁺ y 9 Ca²⁺, con un potencial osmótico es de -0.072 MPa. Como fuente de micronutrientes, se utilizó el producto comercial Tradecorp AZ a razón de 0.066 g L⁻¹. Se aumentó y se redujo en una misma proporción (25%) los miliequivalentes para los nutrientes siguientes: Nitrato, Fosfato, Potasio y Magnesio. El potencial osmótico de las soluciones nutritivas se ajustó a -0.072 MPa, es, decir, una conductividad eléctrica (CE) de 2 dS m⁻¹. El pH se ajustó entre 5.5 y 6 con ácido sulfúrico. Se evaluó el número de hojas desarrolladas y en desarrollo a los 30, 60 y 90 días después del trasplante (ddt). El análisis estadístico de los datos consistió en un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) efectuados con el programa estadístico Statistical Analysis System SAS versión 9.0 (SAS Institute, 1990).

RESULTADOS

Los resultados muestran que a los 30 ddt, se tuvo un promedio de tres hojas desarrolladas sin importar la RM en las que fueron crecidas las plántulas y con un número de dos hojas en desarrollo sin presentar diferencias estadísticas significativas por efecto de los tratamientos (Figura 1).

Para los 60 ddt, se observaron cambios en el número de hojas desarrolladas por efecto de las RM 75 y 100%; mientras que, con la RM 125% se presentó el valor significativamente más bajo, sin que estos fueran diferentes desde el punto de vista estadístico. De igual manera, las hojas en desarrollo fueron muy similares en las plantas tratadas con las tres RM, sin diferencias estadísticas significativas (Figura 2).

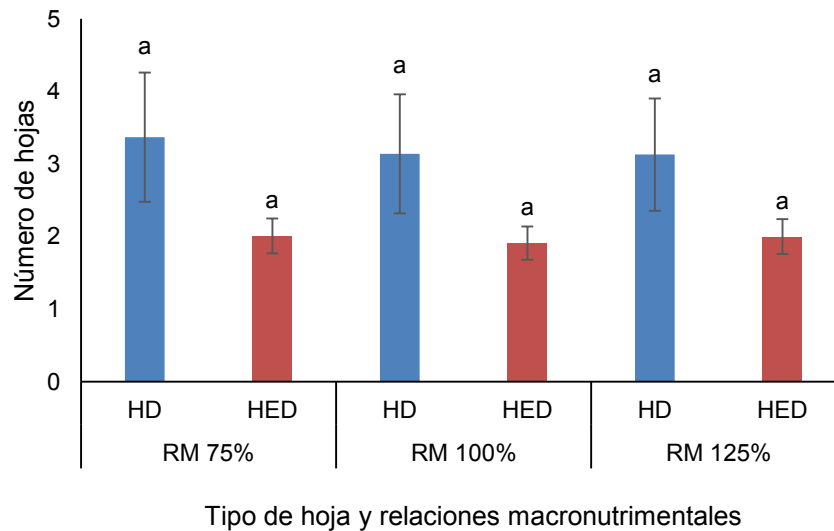


Figura 1. Número de hojas desarrolladas (HD) y en desarrollo (HED) en plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086, a los 30 ddt por efecto de tres relaciones macronutrientales (RM). Medias ± DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

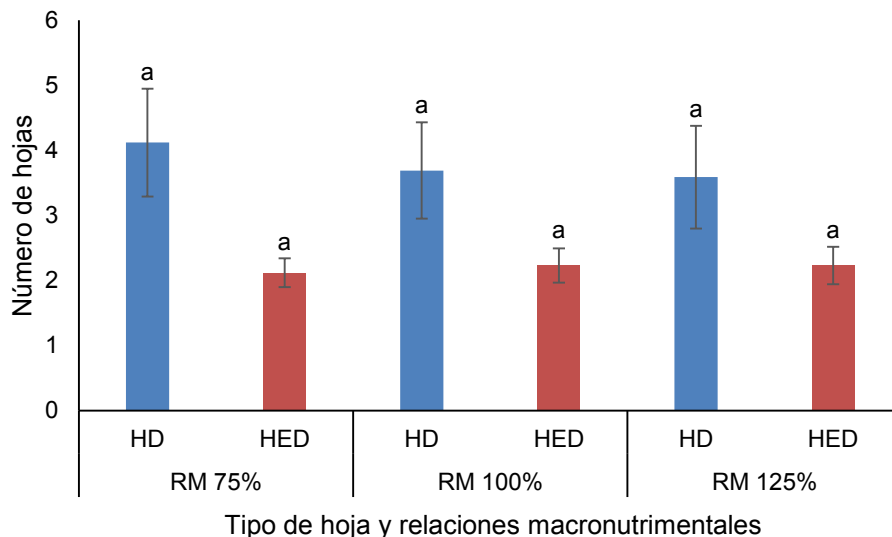


Figura 2. Número de hojas desarrolladas (HD) y en desarrollo (HED) en plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086, a los 60 ddt por efecto de tres relaciones macronutrientales (RM). Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En el último periodo de evaluación (90 ddt), el número de hojas desarrolladas y en desarrollo por efecto de las tres RM no mostraron diferencias estadísticas. Sin embargo, para ambos tipos de hojas, la RM 100% produjo los valores más altos (Figura 3).

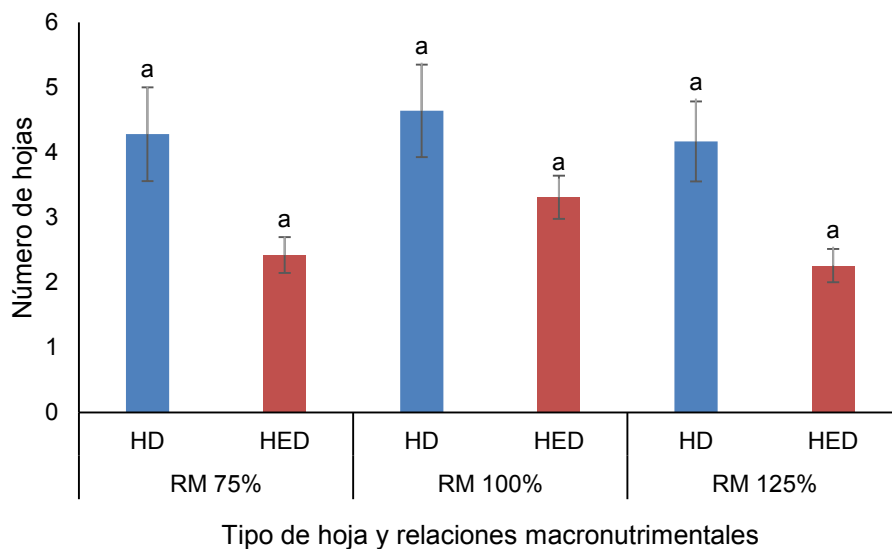


Figura 3. Número de hojas desarrolladas (HD) y en desarrollo (HED) en plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086, a los 90 ddt por efecto de tres relaciones macronutrientales (RN). Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

En conclusión, las relaciones macronutrimientales evaluadas no tienen efecto en las primeras etapas de crecimiento y desarrollo de hojas de plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. A. Steiner, "The universal nutrient solution. pp. 633-649". *In: Proceedings of Sixth International Congress on Soilless Culture. International Society for Soilless Culture. Lunteren, The Netherlands. 1984.*
2. R. Hunt, "Plant growth analysis", Edward Arnold Publishers, London. 1978, 67 p.
3. F.B. Salisbury, C.W. Ross, "Fisiología vegetal", Grupo Editorial Iberoamérica S.A., México. 1994, 759 p.
4. L. Rodríguez, "Densidad de población vegetal y producción de materia seca", Revista COMALFI. Vol. 27, 1-2, 200, pp. 31-38.
5. SAS Institute Inc., SAS/STAT Users Guide. Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA), 2011.

LA CONCENTRACIÓN DE MACRONUTRIENTES EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA AFECTAN LA ALTURA Y DIÁMETRO DEL TALLO DE PRIMERA EMISIÓN DE VITRO PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR

Senties-Herrera, H.E.¹; Gómez-Merino, F.C.¹; Trejo-Téllez, L.I.¹; Cadena-Iñiguez, J.²; Sánchez-García, P.¹; Volke-Haller, V.H.¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230.

²Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. Calle de Iturbide 73, San Agustín, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. C. P. 78622.
correo-e: hector.senties@colpos.mx

RESUMEN

El manejo de la nutrición vegetal puede contribuir a mejorar características morfológicas, el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que un adecuado suministro de nutrimentos puede beneficiar dichas características. En este estudio, se evaluó el crecimiento y desarrollo del tallo de plántulas de caña de azúcar variedad CP 72-2086 crecidas en tres relaciones macronutrientales (RM) con el aumento y decremento de un 25% de los nutrimentos N, P, K y Mg respecto a la solución nutritiva de Steiner tomada como 100% (RM 75, 100 y 125%) en la altura y diámetro del tallo a los 30, 60 y 90 días después del trasplante (ddt). El análisis de los datos indica para los primeros 30 ddt, las variables altura y diámetro del tallo no fueron afectadas por las RM probadas. Sin embargo, para los 60 ddt, la mejor RM fue la que contenía el 100% de la concentración original de nutrimentos, ya que incrementó significativamente el valor de estas variables en 45 y 22%, respectivamente, en comparación con las RM 75 y 125%. A los 90 ddt, la RM 125% aumentó el valor de altura y diámetro de tallo en 16 y 18%, respectivamente, en comparación con las dos RM restantes, que obtuvieron valores estadísticamente semejantes entre ellas. En conclusión, el aumento de la concentración de nutrimentos en la solución nutritiva influye de manera positiva en la estimulación del crecimiento y desarrollo de plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento y desarrollo de un cultivo, en términos biológicos, depende de una serie de factores internos y externos, tales como el cultivar (su genotipo), ambiente de crecimiento, y condiciones de producción, los cuales definirán la producción comercial desde el inicio del ciclo (Poorter *et al.*, 2014; Körner, 2015). Dichos factores afectan por diferentes vías la diferenciación y expansión de órganos, el almacenamiento de recursos por parte de ellos y la distribución de los mismos (partición) entre los distintos órganos de la planta. Como resultado de estos efectos se producen modificaciones en el crecimiento y desarrollo entre las distintas partes de la planta. Para un óptimo crecimiento y desarrollo de la planta de caña de azúcar, los nutrimentos deben encontrarse en cantidades adecuadas y en la forma disponible, en cada una de las etapas fenológicas de demanda de cultivo. La respuesta de la caña de azúcar a altas cantidades de nutrimentos es mucho de los casos es positiva, por ello se le considera como un cultivo altamente demandante (Gopalasundaram *et al.*, 2012).

Por otra parte, el uso racional de las fuentes de nutrimentos químicos constituye una parte medular para que el cultivo alcance altos rendimientos, sin embargo, en el actual escenario de conservación del ambiente y los altos costos de los fertilizantes, se tiene que crear alternativas para el uso oportuno y eficiente de éstos para su máximo aprovechamiento (Franco y Otto, 2011; Salgado *et al.*, 2003).

En el contexto anterior, se planteó el presente trabajo de investigación con el objetivo de evaluar tres relaciones macronutrientales (RM) consistentes en el aumento y en el decremento de un 25% de los nutrimentos N, P, K y Mg, tomando como referencia la solución de Steiner, considerada como 100%; por tanto, las RM consideradas fueron 75, 100 y 125%, en la altura y diámetro de tallos de primera emisión durante 90 días de crecimiento de plantas de caña de azúcar variedad CP 72-2086.

PARTE EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó en condiciones de invernadero en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, cuyas coordenadas geográficas son 19° 28' 05" latitud norte y 98° 54' 09" longitud oeste, a una altitud de 2,220 m.

El material vegetal utilizado, corresponde a vitroplantas de caña de azúcar variedad CP 72-2086 provenientes de la Biofábrica Vitromotz. La plantación se realizó en bolsas para vivero de 25 x 25 cm con tezontle rojo (granulometría de 2 a 5 mm). La unidad experimental fue una bolsa con una vitroplanta. Después del trasplante, las plántulas fueron regadas nueve veces al día (7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17 y 18 horas) con las diferentes soluciones modificadas a partir de la solución universal Steiner (Steiner, 1984). El pH de las soluciones fue ajustado a 5.5 con ácido sulfúrico concentrado. Las soluciones nutritivas fueron preparadas con fertilizantes de alta pureza.

El diseño de tratamientos fue a partir de la solución universal de Steiner (Steiner, 1984), para el diseño de las relaciones de macronutrientes (Cuadro 1). La composición base fue la siguiente: (meq·L⁻¹): 12 NO₃⁻, 1 H₂PO₄⁻, 7 SO₄²⁻, 7 K⁺, 4 Mg²⁺ y 9 Ca²⁺, con un potencial osmótico es de -0.072 MPa. Como fuente de micronutrientes, se utilizó el producto comercial Tradecorp AZ a razón de 0.066 g L⁻¹. Se aumentó y se redujo en una misma proporción (25%) los miliequivalentes para los nutrientes siguientes: Nitrato, Fosfato, Potasio y Magnesio.

El potencial osmótico de las soluciones nutritivas se ajustó a -0.072 MPa, es, decir, una conductividad eléctrica (CE) de 2 dS m⁻¹. El pH se ajustó entre 5.5 y 6 con ácido sulfúrico. Se evaluó la producción de biomasa fresca a los 30, 60 y 90 días después del trasplante (ddt) con la separación de la planta por órganos (tallo, vaina y hojas).

Para determinación de la altura de planta se utilizó un flexómetro marca Truper, y para el diámetro se utilizó un calibrador digital tipo vernier estándar y milimétrico Truper 14388. El análisis estadístico de los datos consistió en un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) efectuados con el programa estadístico Statistical Analysis System SAS versión 9.0 (SAS Institute, 1990).

RESULTADOS

La altura del tallo se vio influenciada de manera diferencial por las relaciones macronutrientales de la solución nutritiva (Figura 1). En el primer periodo de evaluación (30 ddt), la altura del tallo no mostró diferencias estadísticas significativas. En la segunda evaluación realizada 60 ddt se vio una respuesta positiva de la RM 100% en la altura de la planta, mientras que con las RM 75% y RM 125%, el crecimiento se vio inhibido lo cual puede ser ocasionado por falta o exceso de nutrientes, respectivamente. Sin embargo, en el tercer periodo de evaluación (90 ddt), se observó una relación positiva entre la altura de la planta y la relación macronutriental; es decir existió mayor crecimiento a medida que la concentración de macronutrientes se incrementó en la solución nutritiva.

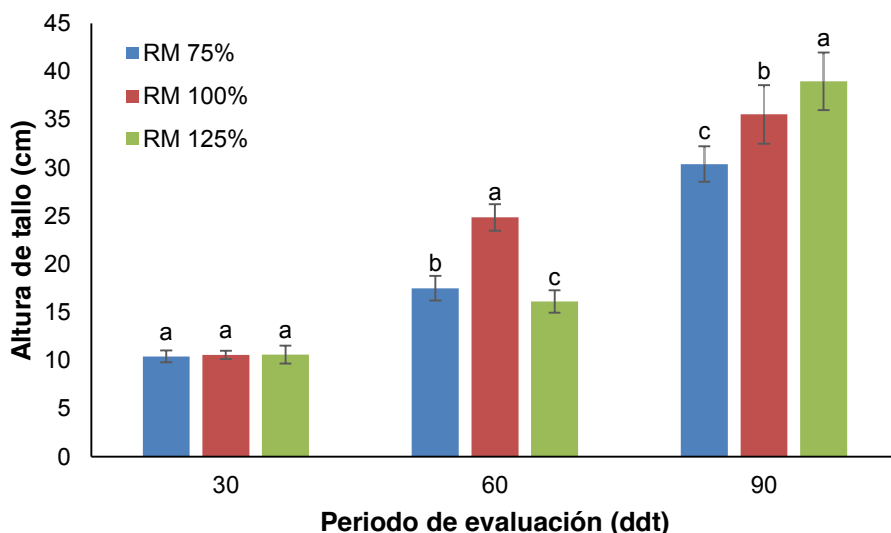


Figura 1. Altura de tallos de caña de azúcar variedad CP 72-2086 a los 30, 60 y 90 ddt por efecto de tres relaciones macronutrientales (RM). Medias \pm DE con letras distintas en cada columna, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

La variable diámetro del tallo presentó una respuesta muy similar a la altura de la planta. Para los 30 ddt, el diámetro no mostró una diferencia estadística significativa; por el contrario, para los 60 ddt, la RM 100% fue la que mostró el mayor incremento en el diámetro. Para el final del periodo de evaluación (90 ddt), con la RM 125% se obtuvieron los mayores diámetros de tallo, en comparación con los dos RM restantes, siendo estas últimas estadísticamente iguales (Figura 2).

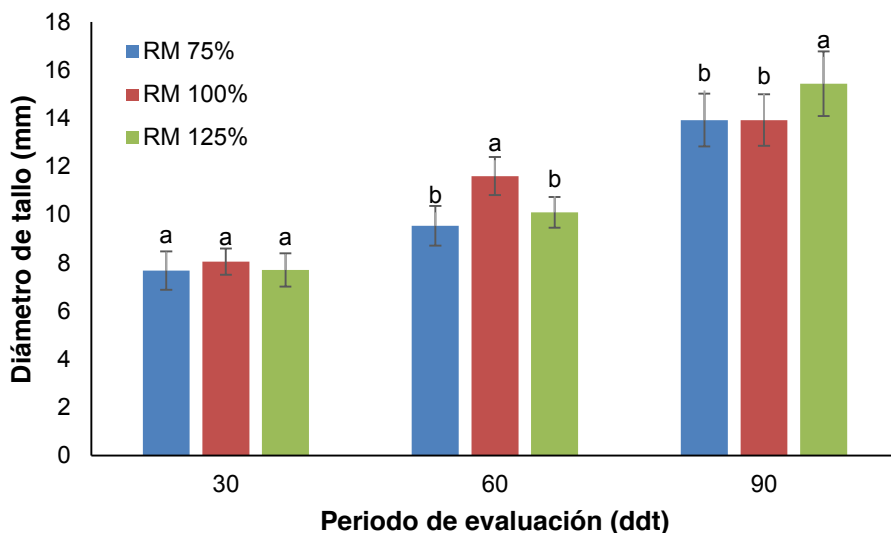


Figura 2. Altura de tallos de caña de azúcar variedad CP 72-2086 a los 30, 60 y 90 ddt por efecto de tres relaciones macronutrimientales (RM). Medias \pm DE con letras distintas en cada columna, indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

Para incrementar la altura de planta y el diámetro de tallos de primera emisión en la variedad CP 72-2086 de caña de azúcar, se recomienda iniciar un manejo nutricional con una dosificación baja (RM 75%) hasta los 30 ddt; posteriormente, cambiarla a una dosis media (RM 100%) hasta los 60 ddt, y terminar con una dosis alta (RM 125%) a los 90 ddt, de los cuatro macronutrientes N, P, K y Mg.

BIBLIOGRAFÍA

1. P. Gopaldasundaram, A. Bhaskaran, P. Rakkiyappan, "Integrated nutrient management in sugarcane", Sugar Tech. Vol. 14, 1, 2012, pp. 3-20.
2. A. A. Steiner, "The universal nutrient solution. pp. 633-649", *In: Proceedings of Sixth International Congress on Soilless Culture*. International Society for Soilless Culture. Lunteren, The Netherlands. 1984.
3. C. Körner, "Paradigm shift in plant growth control", Current Opinion in Plant Biology. Vol. 25, 2015, pp.107-114.
4. H. Poorter, H. Lambers, J. R. Evans, "Trait correlation networks: a whole-plant perspective on the recently criticized leaf economic spectrum", New Phytologist. Vol. 201, 2, 2014, pp. 378-382.
5. J. E. C. Franco, R. Otto, "Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions", Field Crops Res. Vol. 121, 1, 2011, pp. 29-41.
6. S. Salgado, M. Núñez, J. J. Peña, J. D. Etchevers, D. J. Palma, R. M. Soto, "Manejo de la fertilización en el rendimiento, calidad del jugo y actividad de invertasas en caña de azúcar", Interciencia. Vol. 28, 10, 2003, pp. 576-580.
7. SAS Institute Inc., SAS/STAT Users Guide. Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA), 2011.

EFFECTOS DEL SILICIO EN LA CONCENTRACIÓN DE BIOMOLÉCULAS EN PLANTAS DE ARROZ SOMETIDAS A ESTRÉS OSMÓTICO

Sara Monzerrat Ramírez-Olvera¹, Libia Iris Trejo-Téllez^{1*}, Fernando Carlos Gómez Merino¹, Juan Antonio Pérez Sato², Cesar Antonio Casasola Elizondo¹, Victor Hugo Carbajal Vázquez¹ María de la Luz Buendía Valverde¹,

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ramirez.sara@colpos.mx; tlivia@colpos.mx*; fernandg@colpos.mx; casasola.cesar@colpos.mx; buendia.luz@colpos.mx; carbajal.victor@colpos.mx

²Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, pantonio@colpos.mx

RESUMEN

El estrés osmótico es uno de los principales factores que afecta el crecimiento y la productividad de plantas. Diversos estudios han mostrado el efecto de elementos benéficos en la tolerancia a factores de estrés. En este contexto el objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de la aplicación de Si suministrado a partir de SiO₂ a plantas de arroz sometidas a estrés osmótico, en la concentración de clorofila total y azúcares solubles totales. Plántulas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) cultivar Morelos A-98 de 12 d de edad, fueron colocadas en solución Magnavaca por 7 d y posteriormente en solución Yoshida. Catorce días después se adicionaron 1 y 2 mM SiO₂ y a los 28 d posteriores, las plantas se sometieron a estrés osmótico con la adición de PEG 8000 al 10%. Las plantas se cosecharon y se determinó la concentración de clorofila y azúcares totales en vástago y raíz. La aplicación de 2 mM Si incrementó significativamente la concentración de clorofila total y el tratamiento con 1 mM Si aumentó significativamente la concentración de azúcares en vástago de las plantas sometidas a estrés. Los resultados obtenidos indican que la aplicación de Si tiene un efecto benéfico para plantas de arroz Morelos A-98 en condiciones de estrés osmótico.

INTRODUCCIÓN

El arroz se cultiva en un área de aproximadamente 158 millones de hectáreas y alrededor del 90% del arroz en el mundo se cultiva en Asia, y China es el principal productor. En América Latina se producen alrededor de 25 millones de toneladas (Seck *et al.*, 2012). Sin embargo, la producción de este cultivo a nivel global se ve amenazada por los efectos del cambio climático, principalmente por el aumento de las temperaturas y por los cambios en los regímenes pluviales. Estos factores impactarán de manera negativa el crecimiento y la productividad, conduciendo a una amplia gama de respuestas en las plantas, que incluyen cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Zandalinas *et al.*, 2018).

En condiciones de estrés por deficiencia de agua, se afecta principalmente la tasa fotosintética, causada por el cierre estomático, lo que a su vez se refleja en la reducción en la producción de biomasa, además de reducir el contenido de clorofila (Moreno *et al.*, 2009). En este contexto es de suma importancia la búsqueda de alternativas que le permitan a la planta tolerar condiciones de estrés, donde la nutrición vegetal es de suma importancia.

El silicio es un metaloide sólido de color gris, el cual no es considerado esencial para las plantas, pero su aplicación ha mostrado mejoras en el crecimiento y desarrollo de algunas especies. Estudios han reportado que su aplicación reduce los síntomas relacionado con la deficiencias de agua (Richmond y Sussaman, 2003), al aumentar el grosor de la superficie de las hojas y reducir la pérdida de agua (Hodson *et al.*, 2005). Así también Gunes *et al.* (2008), mencionan que el Si puede aumentar las actividades de las enzimas antioxidantes y reducir el daño oxidativo de las especies que se encuentran en condiciones de estrés.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Semillas de arroz (*Oryza sativa*) del cultivar Morelos A-98 se utilizaron en esta investigación, las cuales se depositaron en frascos de vidrio con MS suplementado con agarosa al 3% y se colocaron en oscuridad por 3 d y a luz natural por 11 d.

Crecimiento vegetativo y aplicación de tratamientos

Las plántulas de 12 d de edad se transfirieron a un sistema hidropónico en condiciones de invernadero, en contenedores de 14 L con solución nutritiva Magnavaca por 7 d y solución Yoshida por los 7 d posteriores. Catorce días después del trasplante se adicionaron a la solución nutritiva 1 y 2 mM Si a partir de SiO_2 (dióxido de silicio) y a los 28 d posteriores las plantas se sometieron a estrés osmótico con la adición de polietilenglicol 8000 (PEG 8000) al 10%. A los 7 d del inicio del tratamiento con PEG, las plantas se retiraron de la solución nutritiva, se enjuagaron, se separaron en vástago y raíz y se maceraron con nitrógeno líquido para determinar la concentración de clorofila y prolina.

Determinación de clorofila y azúcares solubles totales

La concentración de clorofila se determinó mediante la suma de la concentración de clorofila a y b, para lo cual se tomaron 60 mg de tejido fresco previamente macerado en nitrógeno líquido y se sometieron a una triple extracción etanol (80, 80 y 50%), mediante la incubación de las muestras a 80 °C y su posterior centrifugación a 14000 rpm durante 5 min, para obtener un sobrenadante en cada extracción y finalmente mezclar los tres extractos obtenidos y leer en el espectrofotómetro a 635 y 645 nm.

Para la determinación de la concentración de azúcares totales, se utilizaron 500 mg de tejido fresco de vástago y raíz, posteriormente se realizó la extracción con 50 mL de etanol (80%), y se filtró el sobrenadante, para posteriormente tomar 1 mL del extracto obtenido y se le agregaron 5 mL de antrona 0.4% (w/v) en H_2SO_4 concentrado. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en baño María a 95 °C durante 15 min. Para la cuantificación se realizó una curva estándar usando glucosa y se midió a una absorbancia de 600 nm.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza a los datos obtenidos de concentración de clorofila total y azúcares solubles totales y comparación de medias con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

La adición de 1 mM Si a plantas de arroz bajo estrés osmótico, no afectó significativamente la concentración de clorofila total, mientras que la adición de 2 mM Si la incrementó significativamente, superando a la concentración registrada en el testigo en 33.33% (Figura 1).

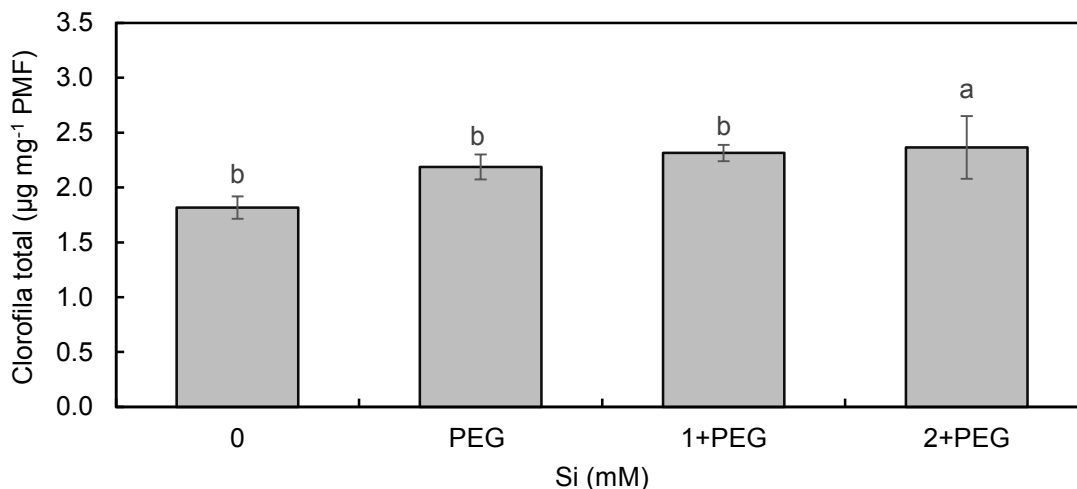


Figura 1. Concentración de clorofila total en vástago de plantas de arroz tratadas con 1 y 2 mM Si, sometidas a estrés osmótico con PEG 8000 al 10%. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). PMF=Peso de materia fresca.

La concentración de azúcares solubles en vástago y raíz no fue afectada significativamente por la adición de 1 y 2 mM Si, respecto al testigo sin Si. Sin embargo, en vástago la adición de 1 mM Si,

incremento significativamente la concentración de azúcares en 73.33% respecto a las plantas bajo estrés osmótico, sin la aplicación de PEG (Figura 2).

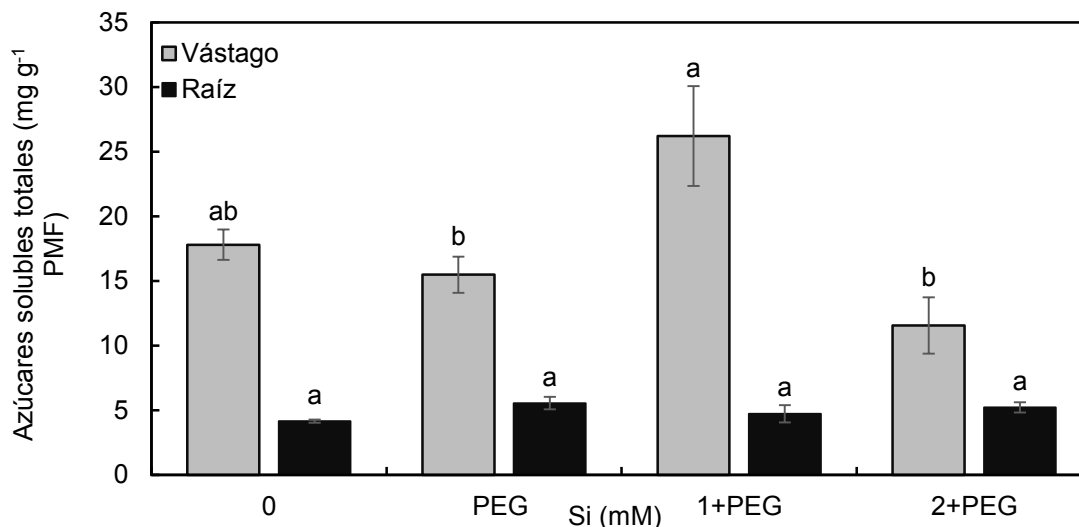


Figura 2. Concentración de azúcares solubles totales en vástago y raíz de plantas de arroz tratadas con 1 y 2 mM Si, sometidas a estrés osmótico con PEG 8000 al 10%. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). PMF=Peso de materia fresca.

CONCLUSIONES

La adición de Si a plantas de arroz Morelos A-98 bajo estrés osmótico mejora la concentración de azúcares totales en vástago.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Gunes, D. J. Pilbeam, A. Inal, S. Coban. Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* Vol. 39, 2008, pp. 1885-1903.
2. K.E. Richmond, M. Sussaman. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion Plant Biol.* Vol. 6, 2003, pp. 268-272.
3. L. P. Moreno. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, Vol. 27, 2, 2009, pp. 179-191.
4. M.J. Hodson, P.J. White, A. Mead, M.R. Broadley. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annal. Bot.* Vol. 96, 2005, pp.1027-1046.
5. P.A. Seck, A. Diagne, S. Mohanty, M.C. Wopereis. Crops that feed the world 7: Rice. *Food Security*, Vol. 4, 1, 2012, pp.7-24.
6. S. I. Zandalinas, R. Mittler, D. Balfagón, V. Arbona, A. Gómez-Cadenas. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, Vol. 162, 1, 2018, pp. 2-12.

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA PRODUCCIÓN AZÚCARES REDUCTORES EN FORRAJES DE MAÍZ Y SORGO DURANTE EL PROCESO DE ENSILADO

María del Sugeyrol Villa Ramirez, Carolina Ramírez-López, Karla Nallely Rivera-Hernández y Miguel Angel Plascencia-Espinosa.

Instituto Politécnico Nacional-Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.
sugeyrol@hotmail.com

RESUMEN

El proceso de ensilado, es un proceso de conservación de materiales vegetales para alimentación animal, este proceso nos permite llevar a cabo la conservación durante largos periodos en los cuales es difícil producir estos materiales vegetales. Su éxito, se encuentra asociado a ciertos factores como el contenido de compuestos nutrimentales en el material vegetal, edad de la planta, pH, procesos de inocuidad en el proceso de ensilado, así como aireación y/o compactación del material durante el ensilaje (Wilkinson y col. 1996). Para la realización de este trabajo se utilizaron 2 diferentes materiales vegetales para ensilar, los cuales fueron maíz y sorgo y para cada material a ensilar, se realizaron 10 diferentes tratamientos de ensilado suplementado, los suplementos que se usaron fueron, melaza, savia fermentada de agave en forma estéril y pasteurizada, microorganismos con actividad probiótica de tipo aerobio y anaerobio y la evaluación se realizó durante 30 días, los parámetros que se evaluaron fueron: contenido de ARD, pH, Fibra cruda, y características organolépticas. El tratamiento que permitió mejores características de palatabilidad como alimento animal, fue donde se usó la mezcla de aditivos de melaza, savia fermentada de agave en forma estéril y adición de microorganismos anaerobios. Comparativamente entre los 2 materiales vegetales que se ensilaron el mejor fue Maíz. Se concluye, que la adición de microorganismos con actividad probiótica, mejora las características organolépticas del ensilado, hace más eficiente el proceso de ensilado y disminuye la actividad de microorganismos butiricos, así como la adición de suplementos estériles en el ensilaje, permitiendo que el contenido de azúcares iniciales en 1.8 g/l se incremente al final a 3.7 g/l, el pH no mostró cambios comparativos y la fibra cruda se incrementó entre 10-15%. Por tanto, la savia fermentada de agave aporta elementos nutrimentales que sirven tanto para incrementar la actividad microbiana de bacterias probióticas, y como aporte nutrimental en el propio ensilado.

INTRODUCCIÓN

Los productores de carne la mayoría de las veces se encuentran preocupados debido al uso de antibióticos y quimioterapéuticos que son usados en los animales de ganado, se usan principalmente porque permiten eliminar cierto tipo de enfermedades y problemas físicos asociados en los animales, sin embargo, afecta la actividad funcional de la flora bacteriana del tracto digestivo y generan costos asociados (Odeón M.M y col., 2017).

Algunos especialistas de la FAO y OMS en 2002 han realizado estudios sobre las propiedades nutrimentales que presenta la adición de probióticos en alimentos usando microorganismos vivos, la mayoría son bacterias de tipo láctico, los cuales se han usado adicionándolos en los alimentos y actúan de forma beneficiosa en la salud del huésped, además estimulan la respuesta inmunitaria, disminuyendo el uso de antibióticos y hormonas.

Los estudios que se han realizado sobre el manejo de forrajes para alimentación ganadera permite no solo el almacenamiento y conservación por tiempos prolongados, requiere además, de un adecuado manejo de condiciones anaerobias para su exitosa conservación y uso, así como de adición de suplementos que permitan eficientizar la actividad microbiana y elevar su contenido nutrimental (Smith y col 1972, Galina, 2007).

Un buen ensilado debe reunir características de olor agradable, color café olivo, tener entre 60 y 70% de humedad y sabor dulce para que el ganado lo consuma (Wilkins R.J y col. 1999).

El uso de suplementos adecuados en el ensilaje y el control de microorganismos son la clave para el desarrollo de forrajes alimentarios óptimos, que permitan hacer eficiente la digestión y disminuir el uso de antibióticos y hormonales en el ganado los cuales elevan el costo de alimentación en el ganado (Bargo,2002).

Las temperaturas altas, facilitan el desarrollo de mohos y la actividad de las levaduras durante todo el año, razón por la cual debe evitarse el ingreso de aire dentro del silo y asegurar un triturado fino y buena compactación del silo (Galina M.A. y col 2009).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue la evaluación comparativa de la producción de azúcares reductores en forrajes de maíz y sorgo durante el proceso de ensilado, para el estudio se realizaron 10 diferentes tratamientos de adición de suplementos de activos biológicos para enriquecimiento de forraje para alimentación ganadera, y se desarrollo a partir de la selección y seguimiento de microorganismos con actividad probiótica. El diseño de colecta de muestras de pajas de sorgo y maíz se realizó en la región de Tepetitla, Tlaxcala, también se desarrollo un protocolo de inclusión de microorganismos en proceso de ensilado en donde se tomaron muestras a los 0,1, 2, 3, 7, 15, 25, 30 días de ensilado y los análisis que se realizaron fueron de fibra cruda, pH, propiedades organolépticas y ARD y posteriormente se realizaron pruebas para estandarización del proceso de ensilado en animales de corral en donde se realizaron pruebas con ovinos.

METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el proceso de ensilado, se realizaron 10 diferentes tratamientos, utilizando por separado 2 tipos de materiales; maíz o sorgo esterilizados, en cantidades de 500g a los que se adicionó 30% de suplementos en relación al peso de la muestra. Los suplementos utilizados fueron melaza, savia fermentada de agave y se adicionó separadamente cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios con actividad probiótica. Tanto la melaza como el pulque se pasteurizaron y fueron utilizados debido a su alto contenido de vitaminas, minerales y compuestos orgánicos asimilables por los microorganismos aerobios y anaerobios para llevar a cabo un adecuado proceso de ensilado. Bajo estos criterios se formularon 3 tipos de ensilados suplementados: Para ensilados de 1 suplemento, se usó sólo melaza y/o savia fermentada de agave, aisladamente y a cada tratamiento se aplicó en un 30% en relación al forraje.

Para tratamiento de 2 suplementos se usó melaza + savia fermentada de agave, se agregó en relación al peso del forraje el 15% de melaza diluida y 15% de savia fermentada pasterizada sin diluir.

Para tratamientos de 3 suplementos se usó melaza, pulque y microorganismos aerobios y/o anaerobio, se agregó el 14% de melaza, 14% de pulque pasteurizado y el 2% de microorganismos (se realizó análisis separado con microorganismos aerobios y anaerobios). Posteriormente se realizó la compactación y se tomó muestras de los diferentes ensilados inmediatamente (muestra de 0 días), posteriormente se realizó el cierre del silo, y se tomaron muestras de 1, 2, 3, 7, 15, 25, 30 días.

Los estudios que se realizaron a las muestras fueron: fibra cruda, ARD, y evaluación de características organolépticas. Los resultados que se muestran son resultados comparativos de muestras tomadas en el tiempo cero de inoculación y 30 días de tratamiento.

1. Evaluación de Fibra bruta o cruda

La fibra bruta o cruda, es el residuo libre de cenizas que corresponden a que resulta del tratamiento en caliente con el análisis de fibra bruta o cruda se realizó por el método analítico de Kjeldahl por duplicado. Durante el análisis se evaluaron características físicas y organolépticas en las muestras de ensilados.

2. Adición de suplementos de savia fermentada al inicio del ensilaje

Para el caso de savia fermentada de *Agave. atrovirens*, las muestras fueron pasteurizadas por el método de HTST (Miller Jones, 1992) La cantidad total de los suplementos fue adicionada al material vegetal en relación al peso en un 30% incluido, el inóculo de microorganismos activos fueron adicionados en un 2% (Ver figura 2), en relación al peso la cuenta viable fue de 10^{-4} UFC/mL, finalmente los materiales fueron compactados en bolsas especiales para ensilados. La toma de muestras se realizó a las 0,1, 2, 3, 7, 15, 25, y 60 días.

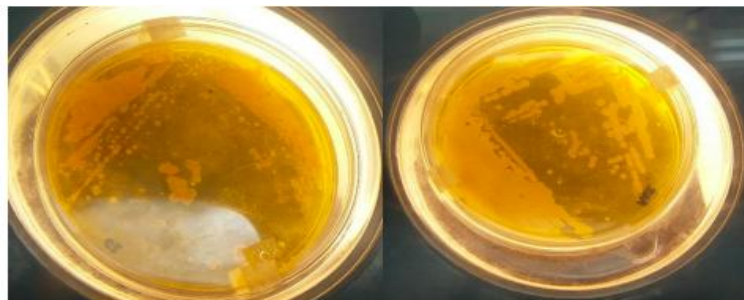


Figura 2. Crecimiento de 72 horas de bacterias anaerobias con actividad probiótica

3. Desarrollo de procesos de validación de forrajes con actividad prebiótica

De acuerdo a análisis preliminares por características, el mejor tratamiento que se obtuvo fue el de melaza+ savia fermentada de agave +microorganismos anaerobios (ver figura 3).

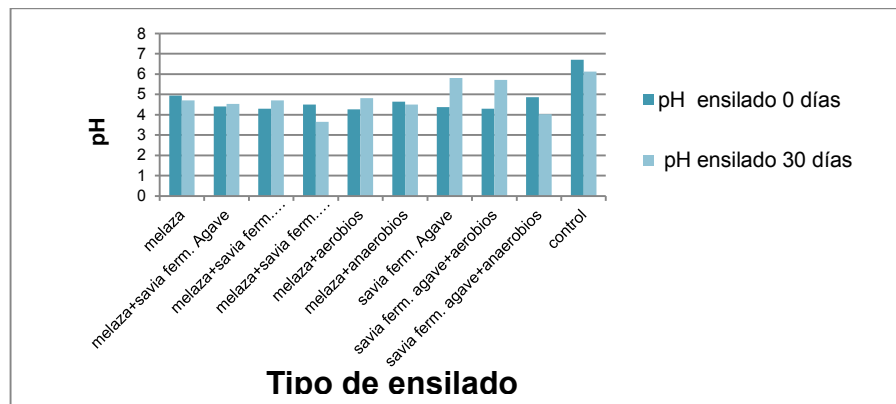


Figura 3. Ensilado suplementado con microorganismos con actividad probiótica

RESULTADOS

Para los resultados de pH se observó que las muestras de ensilado con adición de sólo melaza, y melaza+savia fermentada de agave, no existió diferencia significativa al inicio y final del ensilaje. La adición de microorganismos aerobios incremento el pH y la adición de microorganismos anaerobios disminuye el pH.

Comparativamente en los 2 diferentes materiales, el maíz presenta un pH inicial más bajo que el sorgo y al final de la fermentación en maíz disminuye aún más, El tratamiento de ensilado que presentó mejores características fue el que se suplemento con melaza+ savia fermentada de agave y microorganismo anaerobios, las características de los materiales al final de la fermentación fueron ligeramente ácidas con valores de pH de 3.65 para maíz, de acuerdo a trabajos reportados por Hens Teunissen donde explica que los microorganismos del tipo lactobacilos tienden a soportar ambientes con mayor grado de acidez por tanto las bacterias presentes al final del ensilado son de tipo láctico (BAL), mediante la identificación de crecimiento en placa con medio LB específico para crecimiento de microorganismos lácticos. de esta manera se asegura la presencia de las bacterias adicionadas inicialmente (ver grafica 1 de pH). Los datos de cuenta microbiana no se muestran.



Grafica 1. Comparativa de pH en diversos tratamientos de ensilado al inicio y final de la fermentación.

En relación a las características organolépticas el ensilado que mostró ser más eficiente fue el suplementado con melaza+savia fermentada de agave y microorganismos anaerobios, ya que este tipo de suplementos pueden funcionar para los microorganismos como un medio enriquecido para poder llevar a cabo un adecuado metabolismo en el proceso de fermentación anaerobia del ensilado, y por tanto, los microorganismos en el proceso de ensilaje, realizan un mejor metabolismo que se puede observar por fragmentación del material donde inicialmente se tuvo un tamaño de partícula de 1.2 a 1.7 centímetros y al final del ensilaje fue de 0.5 y 0.7 centímetros, así mismo. los análisis muestra, que se permite el incremento de fibra cruda y proteína la cual fue cuantificable con el método de Tabla 1. Análisis de porcentaje de fibra cruda contenida en los diferentes tratamientos de ensilado evaluado a 0, 15 y 30 días.

Tabla 1. % de fibra cruda con diferentes tratamientos de ensilaje

Tipo de ensilado	% fibra cruda		
	0 días	15 días	30 días
M	60	60	70
M+S.F.A	60	70	70
M+S.F.A+M. Aerobios	60	60	60
M+S.F.A+M.Anaerobios	70	70	70
M+	60	60	70
M. Aerobios			
M+	70	70	70
M.Anaerobios			
S.F.A	60	60	70
S.F.A+ M. Aerobios	70	70	70
S.F.A+ M. Anarobios	70	70	70
Control	50	50	50

*S.F.A=Savia Fermentada de Agave

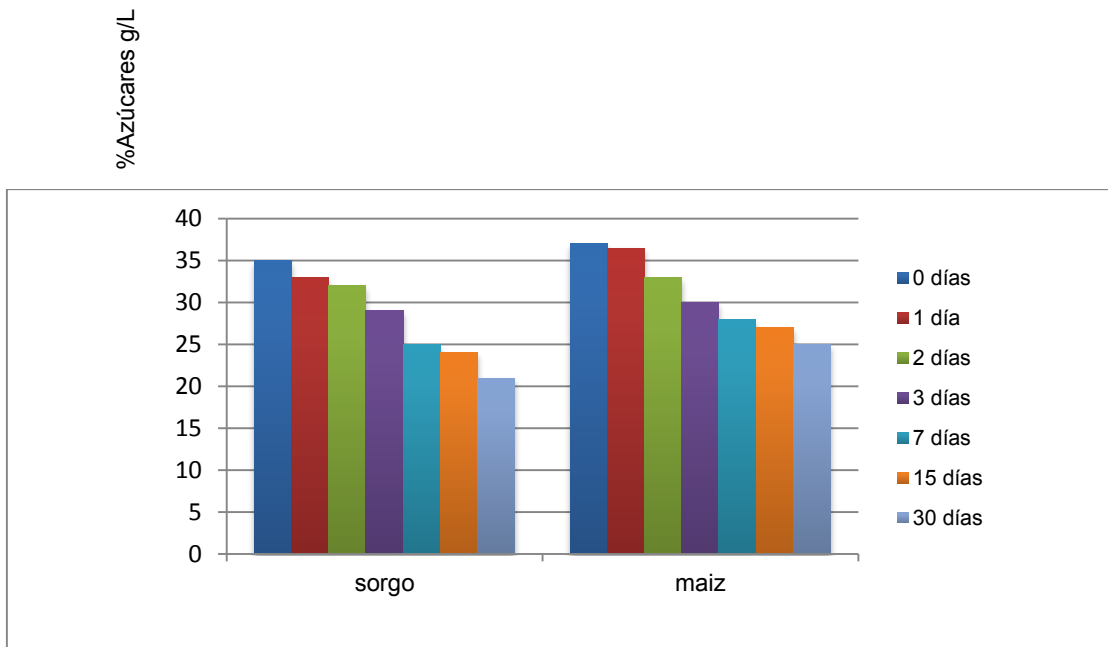
*M. Anaerobios= Microorganismos anaerobios

*M. Aerobios=microorganismos anaerobios

*M= Melaza

Para el análisis de azúcares en los diferentes tratamientos de ensilados, la cantidad de azúcares utilizados por las bacterias no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo fue mayor en tratamientos suplementados con microorganismos anaerobios. Estos datos coherentes con la reducción en los valores de pH, y se explica que los azúcares son la principal fuente de energía para las bacterias lácticas (BAL) presentes en el ensilado. En la literatura se reporta una concentración mínima de carbohidratos solubles del 12% para asegurar una adecuada fermentación, también han sido reportados valores de almidones en maíz para ensilar que varían entre el 29 al 41% dependiendo del estado fisiológico en el cual se realiza la cosecha (Andrade *et al.*, 2001). Estudios realizados por Johnson y col, en 2003, reportan que los azúcares reductores contenidos en los forrajes la mayor concentración de estos azúcares en el maíz en estado de grano se encuentran en forma de almidón, otros autores, reportan valores de almidones al finalizar el proceso de ensilaje entre el 18 y 38%

Para el presente estudio se obtuvieron los mejores resultados con ensilado suplementado con melaza+ savia fermentada de agave y microorganismos anaerobios en donde se encontraron valores superiores al límite inferior de 22% para sorgo. Mientras que otros estudios reportan valores entre 23.2 y 25.8%, para silos de maíz tratados con amonio y ácido propiónico a los 106 días de fermentación (Kung *et al.*, 2000). Las concentraciones de azúcares encontradas en el presente estudio concuerdan en gran parte con los reportes de literatura para sorgo indicando que el cultivo fue cosechado en su estado óptimo para ensilar y el proceso fermentativo se produjo como se esperaba para un buen ensilaje, sin embargo los valores para maíz, son ligeramente mayores (ver gráfica 1).



Gráfica 1. Evaluación comparativa del porcentaje de azúcares presentes en maíz y sorgo, usando el mejor tratamiento de ensilaje y evaluación durante 30 días.

CONCLUSIONES

En los resultados obtenidos podemos concluir parcialmente, que el tratamiento en el que se usaron microorganismos anaerobios generó un ensilado con características organolépticas agradables, los materiales fueron ligeramente más suaves y fragmentados al final del proceso de ensilaje, con una coloración más oscura a la original e índices adecuados de fibra, pH bajo que aseguro la presencia de BAL presentes en el ensilado. En los resultados referentes al análisis de fibra cruda, La savia

fermentada de agave generó una mayor cantidad de fibra y se obtuvieron valores de 70% en relación a los controles que fue de 50% y la melaza presentó valores de 60% y de forma combinatoria savia fermentada de agave+melaza también presentó valores de 70% por tanto podemos concluir que el uso de savia fermentada de agave ayuda a generar una mayor cantidad de fibra necesaria en la alimentación animal y las características organolépticas mejoran durante el proceso de ensilado.

Para este estudio se puede considerar como adecuados los ensilados de tratamientos compuestos por savia fermentada de agave+melaza+ microorganismos anaerobio, se generó mayor cantidad de azúcares con este tratamiento aunque disminuye ligeramente su contenido al final iniciando en maíz don 37 g/l y disminuye al final del ensilaje a 25.6 g/L para sorgo inicia en 35 g/L y disminuye a 21.5 g/L para sorgo, los azúcares que se generan durante el ensilaje son importantes, pues sirven además de indicador de la actividad metabólica asociada de BAL durante el ensilado. El mejor ensilado fue el maíz comparativamente con el sorgo.

REFERENCIAS

1. Almond, W. C., G. Smith y P. Savage.(1979). A comparison of two contrasting types of grain sorghum in the diet of growing pig. *Anim. Prod.* 29: 143-150.
2. Andrade, J. B.; Ferrari Junior, E. & Braun, G. (2001). Valor nutritivo de caña de azúcar tratada com hidróxido de sódio e acrescida de rolão-de-milho. *Pesq. Agropec. Bras.* 36 (10):1265-1268.
3. Alpizar Solis Carlos (2015). Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación en animales, Departamento nutrición animal Universidad de Costa Rica.
4. Atkinson, J. y K. Carpenter. (1970). *J. Sci.Fd.Agric.* 21: 366, 21: 373. En Pond, W. y J.Maner, 1974. Producción de cerdos en climas templados y tropicales. ACRIBIA.
5. Bavera, G. A. (2000). Suplementación mineral del bovino a pastoreo y referencias en engorde a corral. Ed. del autor, RíoCuarto, 15-108; 131-154.
6. Bargo F.; Muller L.D.; Varga G.A.; Delahoy J.E. Y Cadessy T.W. (2002) a. Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85:2964-2973.
7. Beames, R. y J. Sewell. (1969). *Aust. J. Exp.Agric. Anim. Husb.* 9: 482. En Kennedy J. J. et al. 1974. *Int. J. Agric. Res.* 13: 1-10.
8. Cortamira, O. y S. Isern. (1984). Suero de queso con distintos niveles de alimentación suplementario para cerdos en engorde. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 1984 vol. 4(1): 32.
9. Dunne, H. yA.Leman.(1975).*Diseases of swine.* 4^a. edition. Academic Press.
- 10.Hale, O. y L. Thompson. (1986). Influence of particle size of wheat on performance of finishing swine. *Nutritional Reports International.* February 1986 33(2).
- 11.De la Roza Delgado B., Martínez Fernández A., Argamenteria Gutierrez A. (2011). Determinación de materia seca en pastos y forrajes a partir de la temperatura de secado para análisis (SERIDA). España.
- 12.Galina M.A., M.A. Ortiz-Rubio1, F. Mondragón , M. Delgado-Pertíñez y A. Elías. (2009). Rendimiento de terneros alimentados con silo de maíz o láctico con un promotor de la fermentación ruminal.Universidad Nacional Autonoma de México. vol.58 no.223. Córdoba.
- 13.Johnson LM, Harrison JH, Davidson D, Mahanna WC, Shinnors K. (2003). Corn Silage Management: Effects of Hybrid, Maturity, Inoculation, and Mechanical Processing on Fermentation Characteristics. *J Dairy Sci* 2003; 86:287-308
14. Kramer S., Waibel P. Behrends B. And El Kandelgy S. (1978). Amino acid in commercially procuded blood meals. *Agric. Food. Chem.*, 26(4):979-981.
15. Kung Jr., L.; Ranjit, R. N. K.; Chen, J. H.; Golt, C. M. & Pesek, J. D. Microbial populations, fermentation end products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. *J. Dairy Sci.* 83 (7):1479-1486, 2000.
16. Miller Jones, J. (1992). *Food safety.* St. Paul, MN: Egan Press.
17. Muller L. (1999). Programa de suplementación de vacas lecheras de alto potencial genético en pastoreo. Universidad Austral de Chile. Facultad de Cs. Agrarias. Instituto de Producción Animal. En: Curso de Actualización en Producción Animal. Serie B-22. 1- 19 p.

18. Ortiz-Rubio, M.A., E.R. Ørskov, J. Milne and H.M.A. Galina. (2007). Effect of different sources of nitrogen on in situ degradability and feed intake of Zebu cattle fed sugarcane tops (*Saccharum officinarum*). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 139: 143-158.
19. Odeón M.M., Romera S.A., (2017). Estrés en Ganado. Causas y consecuencias. Instituto de Virología, CICVYA-INTA, Hurlingham, Provincia de Buenos Aires, Argentina., Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Univ. de Morón. *Rev.vet.* vol.28 no.1
20. Phillips C.J.C. 1988. The use of conserved forage as a supplement for grazing dairy cows. *Grass and Forage Science.* 43: 215 – 230.
21. Puga, D.C., M.A. Galina, F. Pérez-Gil, G.L. Sanguinez, B.A. Aguilera and G. Haenlein. (2001). Effect of a controlled-released urea supplement on rumen fermentation in sheep fed a diet of sugar cane tops (*Saccharum officinarum*), corn (*Zea mays*) and king grass (*Penisetum purpureum*). *Ruminal fermentation. Small Rum. Res.*, 39: 269-276.
22. Smith, L.W., H.R. Goering and C.H. Gordon. (1972). Relationships of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell wall. *J. Dairy Sci.*, 55: 1140-1147.
23. Wilkins, R.J. et al. (1999). The future role of silage in sustainable animal production. En: *International Silage Conference; silage production in relation to animal performance, animal health, meat and milk quality. 12th Proceedings of the International Silage Conference.* Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1999. p. 23-35.
24. Wilkinson, J.M., Wadepul, F., & Hill, J. (1996). *Silage in Europe: a survey of 33 countries.* Welton, UK: Chalcombe Publication.

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DEL GARBANZO Y SUS HARINAS PROVENIENTE DE TRES VARIEDADES

Aguilar-Raymundo, V. G*. Ayala-González, R., Villalobos-Martinez, C. A.

Programa Académico de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Pénjamo,
Carretera Irapuato - La Piedad Km 44, Predio El Derramadero, Pénjamo, Guanajuato, C.P. 36921,
México. Correo electrónico: vaguilar@uppenjamo.edu.mx

RESUMEN

El garbanzo es una leguminosa que representa una alternativa alimenticia debido a su gran aporte de proteínas, fibra y minerales. En México, la producción de garbanzo ocupa un lugar importante en el mercado de exportación, debido a sus características físicas. Además de su alto potencial nutrimental es necesario aumentar su consumo y diversificar su uso como ingrediente en el desarrollo de productos alimenticios. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del grano y las harinas de tres variedades de garbanzo (Blanco Sinaloa (BS), Blanoro (B) y Costa 2004 (C4)). Las características físicas (largo, ancho y espesor) del grano mostraron valores similares entre sí. Con respecto al color, se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las harinas, los valores de los parámetros de L^* (89.63 – 92.28), a^* (3.22 – 3.55) y b^* (23.12 – 27.14). La capacidad de absorción de agua no presentó diferencias significativas entre los tipos de harina (7.4 – 7.9 %) y en la absorción de aceite mostraron valores de 1.3%; la formación de espuma para las suspensiones acuosas de las harinas fue de un 45%. Finalmente, el contenido de compuestos fenólicos expresados como equivalentes de ácido gálico (71.27 – 113.2 $\mu\text{g/g}$) no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los extractos etanólicos. Los resultados obtenidos hasta el momento, permiten concluir que estas harinas presentan un gran potencial para ser incorporadas a diferentes sistemas alimenticios.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas se producen y consumen ampliamente en todo el mundo. Forman parte de la dieta humana y además contribuyen al bienestar nutricional. Esta leguminosa, es una rica fuente de proteína (18 – 25%), carbohidratos (alrededor del 80%), lípidos (5%), vitaminas y minerales. En México, la producción de garbanzo ocupa un lugar importante en el mercado de exportación, debido a su tamaño, color blanquecino y facilidad para su cocción. En México, la ingesta de este grano es bajo, y entre las principales formas de consumo son tradicional destacan en fresco (asados, cocidos), botana (seco y enchilada), harina para atole (Ultrilla-Coello et al., 2007). La creciente demanda de alimentos requiere generar información sobre tecnologías emergentes para el procesamiento de leguminosas, así como novedosas y potenciales aplicaciones (Ladjal y Chibane 2015), mejorando las propiedades funcionales y nutricionales de los sistemas alimenticios. Por lo tanto, el presente estudio fue identificar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del grano y de las harinas de tres variedades de garbanzo.

MATERIALES Y METODOS

Material experimental. Se emplearon tres variedades de garbanzo tipo kabul (Blanco Sinaloa, Blanoro y Costa 2004), cosecha 2017. El material fue proporcionado por el “Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias” (INIFAP) Celaya, México.

Caracterización física del grano. Las propiedades físicas del grano se determinaron siguiendo los métodos descritos por Ayman et al. (2010). Brevemente, se tomaron 100 granos de garbanzo, y utilizando un vernier (Pretul 16 cm) se tomaron las mediciones de largo (L), ancho (A) y espesor (E) para calcular el diámetro geométrico (D_g) y el porcentaje de esfericidad (%E).

Preparación de las harinas. Se pesaron 50 g de grano de garbanzo de cada variedad, se llevó a cabo la molienda en un Molino de discos manual (Marca Estrella, México), posteriormente, se realizó una segunda molienda. Al término, se realizó el tamizado (250 μm , malla #60). Todos los materiales se colocaron en bolsas resellables (ziplot), se etiquetaron y se guardaron en un lugar fresco y oscuro hasta su análisis.

Determinación de color en el grano y la harina. La medición de color se llevó a cabo empleando un colorímetro (Konica Minolta Modelo 400), primeramente, se calibró con el mosaico blanco, y en un

recipiente se colocaron 5 g de harina de cada variedad. Se registraron los valores en escala CIELAB los parámetros de L^* , a^* y b^* . Se siguió el mismo procedimiento para las harinas.

La capacidad de absorción de agua (CAA) y de aceite (CAO), formación de espuma (FE) se realizaron siguiendo los métodos descritos por Awolu (2017).

Determinación de compuestos fenólicos. Extracción de compuestos. El contenido de fenoles totales fue determinado en las harinas empleando el método de Folin-Ciocalteu (Sanchez-Mendoza et al., 2016) usando ácido gálico como estándar. La absorbancia fue medida a 760 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-Vis Thermo Scientific, Alemania), agua destilada como blanco. El contenido de fenoles totales fue expresado como equivalentes de ácido gálico.

Análisis estadístico. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) donde se determinó si presentó diferencia significativa ($p < 0.05$). Se utilizó el programa Minitab Versión 16.0 (Minitab Inc., Pennsylvania, E.U.).

RESULTADOS

La caracterización física del grano muestran similitudes entre sí. En la tabla 1, se observan los resultados de las propiedades físicas del grano de las tres variedades, destacando que Costa 2004 tiene el menor peso, además de las dimensiones (L, A y E) son pequeños, seguidos de Blanoro y Blanco Sinaloa respectivamente. La variedad Blanco Sinaloa presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) al resto, es un grano de mayor tamaño.

Tabla 1. Resultados de las propiedades físicas del grano de garbanzo

Parámetros	Variedades		
	Blanco Sinaloa (BS)	Costa 2004 (C4)	Blanoro (B)
Peso (g)	0.79 ± 0.89 ^c	0.50 ± 0.08 ^a	0.61 ± 0.09 ^b
Longitud (mm)	12.1 ± 0.11 ^b	10.0 ± 0.06 ^a	10.3 ± 0.08 ^a
Ancho (mm)	8.9 ± 0.07 ^b	7.6 ± 0.07 ^a	7.7 ± 0.07 ^a
Espesor (mm)	0.87 ± 0.07 ^a	0.81 ± 0.07 ^a	0.78 ± 0.07 ^a
Dg	9.9 ± 0.06 ^b	8.5 ± 0.05 ^a	8.6 ± 0.06 ^a
Esfericidad (%)	80.84 ± 0.05 ^a	85.79 ± 0.04 ^c	82.88 ± 0.04 ^b

Los valores representan la media ± desviación estándar

Las muestras que no comparten la misma letra son diferentes significativamente ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey

La determinación de color es un parámetro importante, ya que aporta información sobre en qué tipo de sistemas puede incluirse la harina sin afectar el color del producto. En la tabla 2, se muestran los valores de L^* , a^* y b^* para el grano y la harina, y en ambos se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variedad.

Tabla 2. Parámetros de color en grano y harina de garbanzo

Variedades	Grano		
	L*	a*	b*
BS	81.66 ± 0.97 ^a	11.91 ± 0.49 ^a	21.79 ± 0.27 ^b
C4	74.77 ± 0.78 ^b	12.15 ± 0.35 ^{ab}	20.16 ± 0.64 ^a
B	81.99 ± 0.39 ^a	12.42 ± 0.59 ^b	21.39 ± 0.17 ^a
	Harina		
BS	92.28 ± 0.51 ^a	3.55 ± 0.04 ^a	23.12 ± 0.37 ^b
C4	89.63 ± 0.19 ^b	3.31 ± 0.14 ^{ab}	27.14 ± 0.60 ^a
B	90.96 ± 0.26 ^c	3.22 ± 0.10 ^b	26.83 ± 0.48 ^a

Los valores representan la media ± desviación estándar

Las muestras que no comparten la misma letra son diferentes significativamente ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey

Propiedades funcionales

En relación a las propiedades funcionales de los tres tipos de harinas, no se observan diferencias significativas ($p > 0.05$), mostrando valores similares entre sí. En la tabla 3, se muestran las propiedades funcionales, la capacidad de absorción de agua que varió de entre 7.43 – 7.93 g de agua absorbida por gramo de muestra. Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz (2016), reportan valores menores a los obtenidos en este estudio para harinas crudas sin tamizar, contrario a este estudio que se tamizó hasta obtener un tamaño de 250 μm . La capacidad de absorción de aceite muestra valores de 1.3 – 1.4 g de aceite absorbido por gramo de muestra, estos valores son similares a los reportados por Ladjal y Chibane 2015, con valores de 0.9 – 1.4 g/g. Las suspensiones acuosas de harina mostraron de 45 – 48% de formación de espuma.

Tabla 3. Propiedades funcionales de las harinas de garbanzo

Variedades	CAA (g agua absorbida / g muestra)	CAO (g aceite / g muestra)	FE (%)	Compuestos fenólicos (μg EAG/g extracto)
BS	7.93 ± 0.23	1.30 ± 0.11	45	91.15 ± 3.23
C4	7.46 ± 0.57	1.40 ± 0.20	48	113.20 ± 1.13
B	7.93 ± 0.23	1.30 ± 0.46	45	71.27 ± 3.48

Los valores representan la media ± desviación estándar

Las muestras que no comparten la misma letra son diferentes significativamente ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey

En relación al contenido de compuestos fenólicos en las harinas se observan cantidades menores en relación a otros autores, Segev et al. (2010), reportaron en cascarilla de garbanzo tipo kabuli un contenido de fenoles totales 0.2 -1.1 mgEAG/g. Las diferencias observadas con otros autores se deben a los métodos de extracción empleados, así como a las características propias del grano.

CONCLUSIONES

En el presente estudio muestra las propiedades funcionales de las tres variedades de harina de garbanzo. Los valores de la capacidad de absorción de aceite fueron bajos, sin embargo, pueden mezclarse con otras fuentes proteicas mejorando esta propiedad. Estos resultados preliminares revelan el potencial de incorporarlo en diversos sistemas alimenticios mejorando las propiedades funcionales y nutricionales. Con respecto al contenido de compuestos fenólicos, representa una fuente de compuestos con actividad biológica que incrementaría el valor agregado de los sistemas formulados con este tipo de harinas.

BIBLIOGRAFÍA

1. N.A. Sánchez-Mendoza, J. C. Ruiz-Ruiz, G. Dávila-Ortiz y Jiménez-Martínez, C. (2017). Propiedades tecnofuncionales y biológicas de harina, aislados y fracciones proteicas mayoritarias en semillas de Inga paterno. *CyTA – Journal of Food*. 15:3: 400 – 408.
2. O.O. Awolu. (2017). Optimization of the functional characteristics, pasting and rheological properties of pearl millet-based composite flour. *Heliyon – Elsevier*. No~e00240.
3. V.G. Aguilar-Raymundo y J.F. Vélez-Ruiz. (2016). Characterization of two chickpea varieties and the effect of cooking on their physico-chemical and functional properties of flours. *Journal of Food Research*. 5:5: 67-76.
4. O. Garcia, C. Aiello-Mazzarri, M.C. Peña-Chirino, J.L. Ruiz-Ramírez e I. C. Acevedo Pons. (2012). Caracterización físico-química y propiedades funcionales de la harina obtenida de granos de quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) sometidos a diferentes procesamientos. *Revista Científica UDO Agrícola* 12:4:919-928.
5. E. Ladjal y M. Chibane. (2015). Some physicochemicals and functional properties of pea, chickpea and lentil whole flours. *International Journal of Food Research*. 22:3: 987-996.
6. R. G. Utrilla-Coello, P. Osorio-Díaz y L. Bello-Pérez. (2007). Alternative use of chickpea flour in breadmaking: chemical composition and starch digestibility of bread. *Food Science and Technology International*. 13:4. 323-327
7. A. Segev, H. Badani, Y. Kapulnik, I. Shomer, M. Oren-Shamir M y S. Galili. (2010). Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Science*. 75(2), S115-S119.

CARACTERIZACIÓN SENSORIAL Y FISCOQUÍMICA DEL FRUTO DE TIMBIRICHE (BROMELIA HEMISPHERICA)

Yara Isela Rodríguez Carranza, María Gloria Cornelio Moreno,

Facultad De Químicofarmacobiología, Umsnh. Morelia, Michoacán.

RESUMEN

La finalidad de este proyecto es caracterizar el fruto de timbiriche para dar a conocer sus propiedades y poder darle un valor agregado a este que pertenece familia de las Bromeliáceas aprovechando sus propiedades ya que este fruto es muy poco conocido y explotado.

La bromelia hemisphaerica (timbiriche) es una planta herbácea perenne que crece de manera silvestre en las regiones tropicales y subtropicales de México. Los frutos (60-80) se agrupan en un racimo sostenido por un tallo que surge del centro de la planta. La reproducción es de tipo vegetativo por medio de hijuelos. Su pulpa es blanca cremosa, con semillas negra.

De acuerdo a las determinaciones realizadas de su caracterización se pudo observar que es un fruto con muchas propiedades que podemos aprovechar para enriquecer nuevos alimentos.

INTRODUCCIÓN

Las bromelias pertenece a la familia bromeliaceae, que con prenda a aproximadamente tres mil especies agrupadas en tres subfamilias bromelioideae, pitcairnoideae y tillandsioideae lo que lo convierte en la familia botánica más extensa del neotropico.

Estas plantas poseen características morfológicas que evidencian una larga evolución. Aun cuando se desconoce su antigüedad las especies más antiguas pertenece a la pitcarnoideae

TEORÍA

En México los frutos de *Bromelia* se consumen como fruto fresco o se cocinan para inactivar las cisteína proteasas, enzimas responsables de provocar ardor en la boca después de su consumo en fresco (Hornung 2011a, b). En América Central y del Sur, las preparaciones de los frutos hervidos o infusiones se han utilizado para el tratamiento de la tos y otros trastornos del tracto respiratorio como bronquitis y asma (Argueta, 1994), escorbuto (Chan-Quijano *et al.*, 2013), adiabates y trastornos del sistema urinario (Manetti *et al.*, 2009).

Históricamente las plantas del género *Bromelia*, por las características morfológicas de las hojas con borde espinoso, son utilizadas para la construcción de cercas vivas. En la ganadería, estas especies son alimento y representan una fuente de agua en sitios muy secos; además, sus hojas presentan fibras de buena calidad para su producción), a escala comercial; sin embargo, en la actualidad sólo son estudiadas desde el punto de vista ecológico, taxonómico y etnobotánico (Mondragón *et al.*, 2011). diabetes y trastornos del sistema urinario.

PARTE EXPERIMENTAL

Caracterización fisicoquímica se realizó de acuerdo a la metodología del AOAC.

Determinación de humedad

Se determinó por el método 934.01 de la AOAC (1990). Norma técnica de referencia NMX-F083-S-1986.

La humedad de la muestra se determinó mediante el porcentaje de agua eliminada por evaporación durante un calentamiento en una estufa a 105 °C por 3 h.

Determinación de cenizas

Se determino por incineración por el método 962.02 de la AOAC (1990). Norma técnica de referencia NMX-F-607-NORMEX-2002

El contenido de cenizas presentes en la muestra se determinó por medio de una incineración, previo calentamiento en una parrilla eléctrica para su final calcinación, en una mufla a 560 °C por 3 h.

Determinación de lípidos

Determino por el método 920.85 de la aoac (1997) y nmx-f-615-normex-2004.

Determinación de proteína

Se basó en la determinación de nitrógeno orgánico de la muestra, realizándose en dos partes, la primera consistió en la descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento, en presencia de

ácido sulfúrico concentrado, y luego se registró la cantidad de amoníaco obtenido de la muestra por titulación con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N, en presencia de rojo de metilo. Se le determinó la Caracterización morfológica determinando los parámetros axial y ecuatorial. Determinación de color utilizando colorímetro de reflectancia Hunter Lab Marca Color Flex® para determinar las coordenadas de color luminosidad, a y b

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial fueron de gran utilidad para la elaboración de la botana del fruto del timbiriche ya que esto nos ayudo a verificar la aceptación ó rechazo de producto pero como podemos observar el los resultados son favorables en todos los parámetros de análisis sensorial, en la caracterización morfológica se puede apreciar que la pulpa y la semilla son los componentes más importantes, los resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico el componente mayoritario es la fibra y proteína aunque esto se determino por diferencia.

Tabla 1 caracterización del fruto del timbiriche

Caracterización físico-química		Timbiriche natural	Timbiriche con chile	
Humedad		9.42%	10.39%	
Cenizas		1.08%	4.23%	
Fibra		0.94%	1.16%	
Lípidos		0.7133%	0.7133%	
Proteína y carbohidratos por diferencia		87.8467%	83.5067%	
Sensorial	Color	Olor	Sabor	Textura
F	3.4±0.67	3.4666±0.57	3.4±0.93	3.6333±0.71
N	3.76±0.50	0.7239±0.13	4.2333±0.81	3.4±0.89
CH	4.0333±0.80	3.9±0.60	4.7666±0.43	3.9666±0.96
Caracterización morfológica fruto				
Total, de fruto		3.7333kg		
Cascara		1.1988kg		
Pulpa		1.8586kg		
Semilla		0.1958kg		
Promedio del peso		17.6923±5.005		
Medición Axial		5.2900±0.75		
Medición ecuatorial		2.3156±0.46		

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos del análisis del fruto son favorables por lo que esto es bueno para los productores de este fruto ya que la población tiene poco conocimiento acerca de las propiedades y dando le una presentación como botana deshidratada tuvo buena aceptación por el público esto es de gran importancia ya que se le puede dar diferentes usos y generarle valor agregado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Briones et. Al "Morelos advances de los studios científicos y tecnologicos de la Bromelia hemisphaerica" año 1988, en linea consultada febrero 2018. Disponible en: <http://132.248.35.1/bibliovirtual/libros/Delgadillo/Morelos/Briones.htm>
2. Dubois, M., Guilles, K., Hmliton, J., Rebers, P., & Smith, F., (1956) "colorimetric method for determination of sugars and related substances.
3. Manual de tecnicas quimicas oficiales A.O.A.C. 1990

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE HARINA DE TEPEJILOTE (*CHAMAEDOREA TEPEJILOTE* LIEBM) PARA ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTOS.

Andrea M. Vazquez Alvarado, Gabriela Blasco López, Martha G. Campos Mondragón.

Facultad de Nutrición campus Veracruz, Universidad Veracruzana.

RESUMEN

La palma *Chamaedorea tepejilote* Liebm conocida como tepejilote o pacaya, se encuentra en el sur de México en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca principalmente (CONABIO, 2009). Es utilizada en remedios caseros o preparaciones tradicionales, es utilizada por sus efectos medicinales, para tratar enfermedades respiratorias y se tiene la creencia de que puede intervenir en el proceso de la Diabetes Mellitus (Riquett *et al.* 2013). El objetivo de esta investigación fue analizar bromatológicamente harina de *Chamaedorea tepejilote* Liebm para enriquecer alimentos. Se realizó el análisis de acuerdo a Normas Mexicanas y perfil de ácidos grasos (Sánchez-Machado *et al.*, modificado, 2010), así como la evaluación sensorial de la harina en un producto alimentario. Los resultados encontrados fueron 79.09% de humedad, 14.63% de cenizas; 8.8% de fibra, 1.2% de extracto etéreo, 16.7% proteína y 58.7% carbohidratos. Los ácidos grasos que se identificaron en mayor proporción fueron, ácido behénico (C: 22) 12.52%, el ácido palmítico (C: 16) 10.99% y el ácido lignocérico (C: 24) 9.2%. La harina de tepejilote se incorporó a galletas tipo marineras, las cuales se evaluaron sensorialmente, donde la aceptación del producto por parte de los participantes, fue “me gusta mucho” y “me gusta moderadamente” de acuerdo a la escala hedónica de 9 puntos. Concluyendo que harina a base de *tepejilote*, puede ser un alimento tradicional en la dieta de los mexicanos rica en proteínas y fibra, lo cual ayudaría a promover la producción de dicha palma y poder contribuir a la economía de la zona rural en donde son cosechadas.

INTRODUCCIÓN

La palma de *Chamaedorea tepejilote* es un tipo de planta que se encuentra en el continente Americano que está distribuida desde la parte central de nuestro país, hasta regiones como Colombia, Brasil, Bolivia, entre otros; México es el territorio que posee la mayor diversidad de especies de este género, ya que tiene aproximadamente entre 40 y 50 especies de esta palma, distribuidas en estados como Hidalgo, Chiapas, Tabasco, Veracruz, Oaxaca, principalmente. Desde tiempos ancestrales, el *Chamaedorea Tepejilote Liebm* ha sido utilizado por poblaciones diversas como México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Panamá y el litoral del Pacífico de Colombia como fuente de alimento y medicamento por las propiedades curativas que le atribuyen, logrando así crear remedios para combatir diversas enfermedades como son: tos, dolores musculares, dolor de oído y náuseas. Por su gran utilidad, ha sido un alimento tradicional en ciertas comunidades de las zonas rurales en los estados del continente a través del tiempo, sin embargo, por un desconocimiento acerca de la composición química de esta no se le ha dado una gran importancia, la cual podría resultar como una solución a la problemática que existe de desnutrición y una mala alimentación en el país, así como ampliar los alimentos convencionales a lo largo de la inclusión de esta clase de palmas en la dieta.

TEORÍA

Chamaedorea tepejilote es una planta de bosque común que se encuentra por todo Centro América y está distribuida desde México hasta Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, etc. México posee 46 especies, Guatemala 37, Belice 9, Honduras 17, El salvador, Costa Rica, siendo nuestro país donde se encuentran la mayor cantidad de palmas de esta especie (Mendoza, 1996).

Esta palma se caracteriza por poseer una inflorescencia masculina la cual es comestible y es utilizada como un recurso de medula comestible (corazón de la palma), y las hojas son utilizadas para la elaboración de arreglos florales o como ornamentales (Castillo, 1993). Crecen principalmente en regiones ubicadas a nivel de mar, en bosques montañosos, cumbres de montañas y altiplanicies (Granados, *et al.* 2004).

C. tepejilote desde décadas pasadas ha sido un alimento tradicional en Guatemala y en países vecinos, ésta es conservada y exportada en pequeñas cantidades hacia Estados Unidos y Canadá. Sin embargo, el tepejilote en México se consume principalmente en los estados de Oaxaca y

Chiapas, siendo en la región de Oaxaca donde se consumen en mayores cantidades. Los habitantes de regiones rurales obtienen ingresos de la venta de esta palma, debido a que crece naturalmente (Ramírez, 2001).

El género de *Chamaedorea* es uno de los grupos más diversos de palmas que existen en el continente Americano con un aproximado de 100 especies que se localizan restringidas al sotobosque de selvas húmedas y bosques nublados del neotrópico en donde representan un grupo muy importante. Este se encuentra restringido al continente Americano y se distribuye desde el este y oeste de México, a través de América Central, hasta llegar al oeste de Ecuador y la porción Colombiana del Amazonas, el oeste de Brasil, hasta Perú y el norte de Bolivia (Hodel, 1992)

En México se encuentran alrededor de 45 especies de *Chamaedorea*, de las cuales 21 especies son únicas, por lo que Chiapas y Veracruz son los estados con mayor número de especies, conteniendo 23 y 17 especies respectivamente.

En Veracruz, *Chamaedorea* crece en diferentes localidades como Papantla, Xalapa, Misantla, Huatusco, Fortín, Córdoba, Ixtaczoquitlán, Zapoapan, Catemaco, Tepatlaxco, Tezonapa y Zentla. (Quero, 1994).

La especie de *Chamaedorea tepejilote* tiene una gran importancia económica, en las zonas rurales de cada región, ya que de esta se obtiene una gran variedad de productos y subproductos como material para las viviendas, vestido, combustibles, alimentos, medicinas, artesanías, etc.; que los habitantes utilizan para vender y poder adquirir recursos para subsistir como servicios u otra gama de productos (Castillo, 1994).

Los habitantes de zonas rurales tienen como fuente de alimentación las pacayas y le dan diferentes preparaciones. Las *pacayas* frescas se almacenan para remover la cobertura de la flor para obtener la parte blanquecina comestible. El sabor que tiene es un poco simple, puede ser cocinada envuelta en huevo y frita o cortada y preparada en ensaladas. Otra preparación típica es que las flores se cocinan y se preservan en una solución de vinagre.

El corazón de la palma, que es la parte terminal del corazón es cortada del tronco, y este es preparado con ensalada, limón y sal, o solo cocido con agua o asado. No solo los habitantes aprovechan el corazón, sino también los animales como los caballos y vacas son alimentados con las hojas de la pacaya cuando el pasto es escaso en tiempos de sequía (Castillo et al., 1994).

Otro uso típico que le dan al tepejilote en Guatemala, es la de cocinar un alimento tradicional llamado "bojón", el cual se prepara en los días de fiesta. Mientras que en México es utilizada por sus efectos medicinales, para curar enfermedades respiratorias y se tiene la creencia de que puede intervenir en el proceso de la Diabetes Mellitus (Riquett et al. 2013).

Desde otro punto de vista, la *Chamaedorea* es sin duda un género que por su diversidad y su variabilidad en cuanto su especie, contiene diferentes formas de acuerdo al medio ambiente y el ecosistema en el que se encuentre en cada región, y tiene diversos usos, ya que es altamente demandada como adorno y decoración.

La *Chamaedorea elegans* y *C. Oblongata* son conocidas en el norte de Guatemala como "*Xate hembra o xate y xate macho o jade*" respectivamente, estas dos especies son el sustento anual del comercio local a través de la extracción del producto. El uso que le dan a estas dos palmas es de carácter ornamental, cortan las hojas de estas y son usadas como arreglos florales, para brindar verdor. Los habitantes de las comunidades le atribuyen diversas propiedades a las hojas de *xate*, incluyendo ser alucinógenos y para prevenir el embarazo, tinta especial para imprimir billetes, hasta aceite para la lubricación de máquinas en submarinos nucleares, todo esto no se ha comprobado totalmente (Castillo, 1994).

Se han practicado diversas investigaciones acerca del *tepejilote*, teniendo diferentes perspectivas de esta, tanto como su uso, hasta el contenido nutricional de la palma. Tal como lo demuestra estudio en el cual se encarga de exponer los usos de la *pacaya* y *chapaya* en Palenque, así como el contenido nutricional de dichas plantas, en el cual los resultados demostraron que en la palma *Astrocaryum mexicanum Liebm* (*chapaya*) contiene de energía un total de 50.8kcal, hidratos de carbono 7.6g, proteína 4.2g, lípidos 0.4g, Calcio 50.8mg, Fósforo 85.1mg y Zinc 10.6mg; en la palma *Chamaedorea tepejilote Liebm* (*pacaya*) contiene un total de energía de 37kcal, hidratos de carbono 4.6g, proteína 3.7g, lípidos 0.3g, Calcio 37mg, Fósforo 87.3mg y Zinc 7.87mg. Estas dos palmas suponen que han sido utilizadas desde siglos pasados por los mayas como fuente de alimentación en tiempos de sequía. (Meléndez et al. 2012)

Otro estudio demostró que la *Chamaedorea Tepejilote* tiene efectos hipoglucemiantes; esto lo hicieron mediante el tepejilote aplicado en un extracto acuoso al 10% liofilizado y la aplicación de una solución salina con el fármaco tolbutamida sobre ratones con una glicemia normal. Se administraron dosis de 100, 200 y 300 mg/kg del extracto por vía intraperitoneal y 50 mg/kg de tolbutamida en los ratones, en donde los resultados fueron que la administración del extracto a 300 mg/kg tiene efectos hipoglucemiantes significativos en los roedores en valores semejantes a los efectos hipoglucemiantes que tiene la Tolbutamida (Riquett et al. 2013).

En otro estudio se analizó el contenido de fibra que contienen diversas palmas y el efecto que tienen los procesos sobre el contenido de ésta. Se tomaron muestras de inflorescencias de *Chamaedorea alternans*, *Chamaedorea sp*, *Chamaedorea tepejilote* y *Astrocaryum mexicanum*, a las cuales se dividieron en 3 grupos dependiendo del peso, y se le aplicaron tres diferentes procesos cocido en agua, asado y crudo. Los resultados demostraron que no existía una diferencia al comparar el contenido de fibra dietaria total entre los tres grupos de palmas. Se analizó el contenido de fibra dietaria total, fibra dietaria insoluble y fibra dietaria soluble en las cuatro especies en los que se observó un mayor contenido de fibra dietaria total e insoluble en *Astrocaryum mexicanum* con un porcentaje de 73.82% y 67.01% respectivamente y con una menor cantidad de fibra dietaria soluble en *Chamaedorea alternans* con un porcentaje de 2.20%. (Centurion et al. 2010).

Un estudio realizado por Centurion et al. 2009, demostraron el contenido nutricional de diferentes palmas, tomando como muestra *C. tepejilote*, *C. alternans* y *Astrocaryum mexicanum*, que fueron adquiridas en un mercado en Tabasco para posteriormente determinar la cantidad de humedad, fibra cruda, hidratos de carbono, minerales y fibra dietaria total. Los resultados obtenidos arrojaron que los componentes mayormente presentes son proteína, fibra e hidratos de carbono; siendo *C. alternans* la especie con mayor contenido de proteína cruda con un 25.39% y *C. tepejilote* con el menor contenido de 24.19%; la fibra cruda fue mayor en *C. tepejilote* con un porcentaje de 12.16% y con menor porcentaje en *C. alternans* con 9.84%. En el contenido de minerales se observó que *C. alternans* tiene el mayor contenido de hierro con 25.35mg y el *C. tepejilote* el zinc con 4.94mg. Y respecto al contenido de fibra dietaria total y fibra dietaria insoluble el mayor contenido lo obtuvo *A. mexicanum* con un porcentaje de 76.46% y 67.26% respectivamente. (Centurion et al. 2009)

Se realizó un análisis proximal en donde se determinó la composición química de las inflorescencias de *Chamaedorea tepejilote* cultivada en Chiapas, para analizar diferencias en su composición en comparación con las palmas cultivadas en Tabasco, para posteriormente añadirlas en un Cereal comercial y poder incrementar el aporte de fibra en este. Se realizó mediante la deshidratación del *tepejilote* para después añadirla en diversos porcentajes al cereal (25%, 30%, 40%) en tres diferentes muestras. Los resultados del análisis demostraron los componentes de la palma, estando en mayor cantidad las cenizas (10.95%), grasa (5.95%), fibra (11.81%) e HCO (62.43%), en cuanto a la cultivada en Tabasco, se presentaron diferencias debido al tamaño, peso, forma, color y el lugar de la siembra de la palma. Con respecto a la cantidad de fibra disponible en el tepejilote se encontró que presenta mayor contenido de fibra dietaria insoluble en relación con la soluble, con un porcentaje de 29.15% y 4.68% respectivamente. Demostrando que en 30 g de cereal comercial (Corn Flakes) con el tepejilote adicionado, aportan 2.13g de la ingesta diaria proporcionada, lo cual representa el 5.60% de la ingesta diaria recomendada; mientras que en el Cereal comercial solo se reporta 1 g de fibra, lo cual representa solo el 2.63% de la ingesta diaria recomendada. El estudio demostró que la adición de la palma de tepejilote en el cereal comercial, aumento la cantidad de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, los cuales se aproxima a la cantidad diaria recomendada y una menor cantidad de energía a comparación del cereal comercial (Montejos y Márquez, 2012).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue analizar bromatológicamente la composición de *Chamaedorea tepejilote Liebman*, así como su utilización en la elaboración de un producto alimenticio.

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizó la especie *Chamaedorea tepejilote Liebman* conocida como Tepejilote, la cual se obtuvo del Mercado de la Ciudad de Tuxtpec, Oaxaca; una vez comprada el método de conservación fue a temperatura de congelación al vacío hasta su uso.

La determinación de humedad se llevó a cabo conforme a la Norma Mexicana NMX-F-083-1986; las cenizas se cuantificaron por el método especificado en la Norma Mexicana NMX-F-066-S-1978; para la determinación de extracto etéreo, se utilizó el método Soxhlet con base en la Norma Mexicana

NMX-F-089-1978; la determinación de fibra cruda se realizó de acuerdo con la Norma Mexicana NMX- F-090-S-1978, la determinación de proteína se realizó por medio del método de Kjeldahl-Gunning de acuerdo a la NMX-F-068-S-1980, la muestra se analizó por triplicado en cada una de las determinaciones.

El perfil de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases de acuerdo al procedimiento de *Sánchez-Machado et al. (2010)* modificado. Se pesó 1 g de muestra y se colocó en un matraz Erlenmeyer con tapa roscada de 50 mL, se adicionaron 20 mL de una mezcla de cloroformo: metanol (1:1 v/v) y se colocó en un baño de agua a 60 °C durante 20 min con agitación ocasional para asegurar la completa disolución de la muestra. Posteriormente se adicionaron 10 mL de cloroformo y se agitó el frasco de manera manual durante 3 min. La mezcla fue filtrada con ayuda de vacío a través de papel filtro Whatman No.1. El filtrado fue mezclado vigorosamente con 10 mL de una solución de KCl 1M y se mantuvo en reposo a 4 °C durante toda la noche dentro de un embudo de separación. La fase inferior fue recolectada y evaporada en un rotavapor. Para llevar a cabo la metilación, se tomó una alícuota de 50 µL de la fracción lipídica obtenida y se le adicionaron 500 µL de HCl metanólico 1N y se mantuvo a 60°C durante 2 h. Después se le adicionaron 200 µL de agua y 2 mL de hexano, se tomó la fase orgánica y se le agregó sulfato de sodio anhidro, se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y se tomó aproximadamente 1.5 mL de hexano para realizar el perfil lipídico. Se inyectó 1 µL en un cromatógrafo de gases (Mod. HP 6890) equipado con detector de ionización de flama y una columna (HP-INNOWAX). La inyección se realizó en modo Split 20:1 a una temperatura inicial de horno de 120 °C, la cual se mantuvo durante 2 min y después se programó una rampa de 10 °C/min hasta llegar a 220 °C la cual se mantuvo durante 13 min.

Se formularon galletas tipo marineras con la inclusión de harina de *tepejilote*, en donde se realizaron diversas pruebas con porcentajes de inclusión de harina de *tepejilote* diferentes en el producto seleccionado, los porcentajes utilizados de harina de *tepejilote* fueron de 20%, 15%, 10% y 5%, en combinación de diferentes ingredientes como piloncillo y chipotle, todo esto con el objetivo de disminuir la mayor cantidad posible el sabor amargo que caracteriza al *tepejilote*. El producto final se realizó con un 5% de inclusión de harina de *tepejilote*, con la adición de chiles chipotles.

La evaluación sensorial se realizó en la Facultad de Nutrición de la Universidad Veracruzana, participaron aleatoriamente 51 personas dentro de las que se destacaban alumnos, maestros y personal en general; cada participante valoró la muestra del producto en base a color, sabor y textura del producto en una escala de 9 puntos.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el análisis próximas determinaron que el porcentaje de humedad que tiene el *tepejilote* es de 79.09%, en comparación con lo reportado por *Córdova et al., (2009)* el contenido de humedad es mayor en la especie *Chamaedorea tepejilote*, las diferencias de estos porcentajes pueden deberse a diferentes factores, tales como, el área geográfica, el tipo de suelo o la forma de cultivo.

En cuanto a la determinación de cenizas se obtuvo un porcentaje de 14.63%, lo cual fue menor a lo reportado por *Centurión et al., (2009)*, la materia inorgánica se debe a la presencia de minerales, de acuerdo con *Meléndez et al., (2012)* reporta que la planta *Chamaedorea tepejilote* tiene un alto contenido de potasio, sodio, fósforo, calcio y hierro, demostrando que la planta *tepejilote* tiene un alto contenido de minerales.

En la determinación de fibra los resultados muestran un porcentaje de 8.8%; el porcentaje de extracto etéreo de la muestra arrojó un 1.2%, *Meléndez et al. (2012)* indica que el género *Chamaedorea tepejilote* *Lieb* contiene 0.3 g de grasa, demostrando su bajo contenido de grasa, diferencia que puede ser debido diferentes situaciones de recolección o selección de cultivo.

Los resultados obtenidos en cuanto a la composición de los ácidos grasos del *tepejilote* son en mayor proporción el ácido behénico (C: 22) 12.52%, el ácido palmítico (C: 16) 10.99% y el ácido lignocérico (C: 24) 9.21%. La cantidad de proteína fue de 16.71% de contenido de proteína cruda en las muestras de harina de *tepejilote*. (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido nutrimental de *Chamaedorea tepejilote* Liebm.

Nombre científico	Chamaedorea tepejilote Liebm.
Humedad (%)	79.09
Cenizas (%)	14.63
Fibra (%)	8.8
Proteína (%)	16.71
Extracto etéreo (%)	1.2
Lípidos (g)	0.3
Ácidos grasos (%)	
Ác. Caprílico (C:8)	4.66
Ác. Cáprico (C:10)	5.39
Ác. Láurico (C:12)	7.02
Ác. Mirístico (C:14)	7.53
Ác. Palmítico (C:16)	10.99
Ác. Palmitoleico (C:16:1)	5.00
Ác. Esteárico (C:18)	8.23
Ác. Oleico (C:18:1)	5.34
Ác. Linoléico (C:18:2)	5.12
Ác. Linolénico (C:18:3)	5.03
Ác. Araquídico (C:20)	8.58
Ác. Behénico (C:22)	12.52
Ác. Erúcico (C:22:1)	5.30
Ác lignocérico (C:24)	9.21

Se elaboraron 3 productos diferentes galletas naturales, con chipotle y con piloncillo; en los diversos productos elaborados con la harina de tepejilote con un 20%, las galletas naturales sensorialmente resultaron demasiado amargas, en las pruebas con un 15% de inclusión de harina de tepejilote en galletas naturales aún se presentó el sabor amargo, así que se incluyó chipotle y piloncillo a las galletas, y se disminuyó la cantidad de harina de tepejilote, se realizaron las pruebas con un 10% de inclusión y el sabor no redujo lo amargo, así que se realizó con un 5% de inclusión de la harina de tepejilote con las dos muestras de chipotle y piloncillo.

En los resultados obtenidos en la evaluación sensorial se observó que el 50.98% de los participantes refirieron en cuanto a la textura de las galletas marineras haberles “gustado muchísimo”, por lo que solo 1.9% mostraron “Ni me gusta ni me disgusta”.

En cuanto al sabor un 58.82% de los participantes refirieron la opción “Me gusta mucho”, mientras que solo el 3.9% de los participantes refirieron la opción “me gusta ligeramente”; dentro de los comentarios obtenidos diversos participantes refirieron que el producto “galletas marineras” tenía un sabor picante pero tolerable, el picante que se utilizó contrarrestó el sabor amargo que caracteriza la harina de *Ch. tepejilote*.

Por último, en el color de las galletas un 49.01% refirieron la opción “me gusta mucho” y solo 1.96% refirieron “Ni me gusta ni me disgusta”; en los comentarios los participantes sugirieron la uniformidad en el color de las galletas, ya que había ciertas piezas que tenían un color rojo más intenso que otras. (Figura 1)

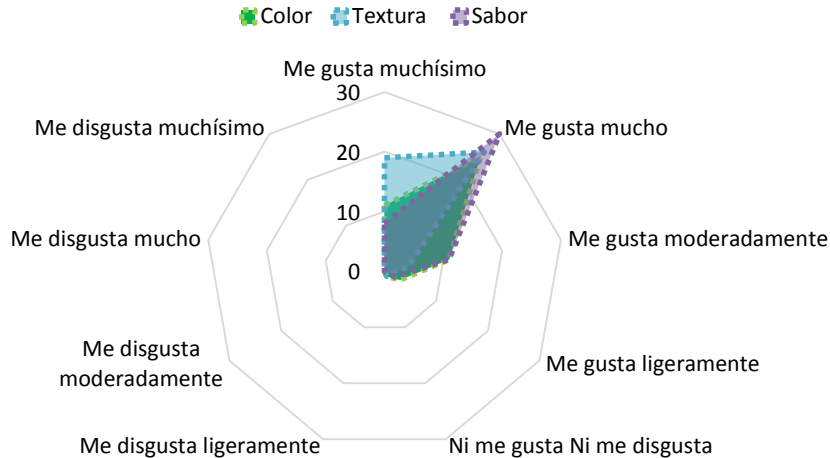


Figura 1. Gráfico sobre la evaluación sensorial.

El producto realizado se le asignó el nombre de “Galletas tipo marineras Jillo’s”; con el slogan “nútrete con cada mordida”. La tabla nutrimental del producto “Jillo’s” se realizó de acuerdo a la Norma-051-SCFI/SSA1-2010, encargada de regular las especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas pre-ensavados; como se muestra en la Figura 2 y 3; los cálculos realizados por nutrimentos fueron de acuerdo al valor diario requerido en una persona adulta, así como los valores de macro nutrimentos se calcularon en base a una dieta de 2000 kcal al día.

El precio total de la elaboración del producto “Jillo’s” fue de una cantidad de \$21.50; por lo que lograría entrar en un precio moderado para su compra.

El producto va dirigido a aquellas personas que tienen una deficiencia de macro y micro nutrimentos como lo son Calcio, Fósforo, Hidratos de Carbono, Fibra dietaria. El aporte de dichos nutrimentos puede ser utilizado en la prevención de enfermedades como lo pueden ser enfermedades de tipo gastrointestinal, puede prevenir el estreñimiento debido a su gran aporte de fibra dietaria; por su alto contenido de ácido fólico puede contribuir a la prevención de enfermedades como anemia megaloblástica y malnutrición.

Por su efecto hipoglucemiante, puede ayudar a disminuir la glicemia en pacientes con resistencia a la insulina o pacientes con Diabetes Mellitus. Por su alto contenido de vitamina B1 puede ayudar a pacientes con afecciones cardíacas y trastornos cerebrales, disminuyendo las complicaciones.

El producto deberá ser limitado en pacientes con enfermedades renales, debido al contenido de sodio en el producto, se deberá tener precaución en el consumo del producto en niños y en pacientes que padecen gastritis o colitis debido a que el producto contiene un sabor picante y en adultos mayores ya que es un alimento crocante, en caso de falta de piezas dentarias.



Figura 2. Etiquetado frontal del producto “Jillo’s”.

INFORMACIÓN NUTRIMENTAL	
Tamaño por ración	100g
Raciones por empaque	4
Cantidad por ración	
Calorías 364	Calorías de grasa 135
% Valor diario*	
Grasa total 15g	23.49%
Grasa Saturada 2.2g	9.9%
Monoinsaturada 8.8g	40%
Colesterol 54mg	18%
Sodio 153mg	6%
Carbohidratos totales 54g	20%
Fibra dietética 4g	15%
Azúcares 3g	1%
Proteínas 7g	12%
Tiamina 17% Ácido Fólico 91% Fósforo 17%	
Riboflavina 10% Hierro 20% Magnesio 10%	
*Los porcentajes de Valores Diarios están basados en una dieta de 2,000 kcal calorías.	

Figura 3. Tabla nutrimental del producto “Jillo´s”.

CONCLUSIONES

El *Chamaedorea Tepejilote Liebmannii* analizado posee un alto contenido de fibra 8.8% superior a otros vegetales como el elote, nopal o cereales como el maíz, por otra parte, los estudios demuestran que la planta tepejilote presenta un bajo contenido lipídico 1.2% en el cual se encuentran presentes diversos ácidos grasos los cuales los encontramos de igual manera en otros alimentos, así como la presencia de ácidos grasos insaturados los cuales se han demostrado ser benéficos para el organismo. Del resultado de cenizas totales se tiene que el *Tepejilote Liebmannii* destaca por su contenido de minerales como son de potasio, sodio, fósforo, calcio y hierro importantes en el funcionamiento del organismo humano.

El tepejilote puede ser un alimento que asegure la ingesta de fibra así como también de minerales, es un alimento que podría proporcionar seguridad alimentaria a las regiones del país. En cuanto al contenido de proteína es importante mencionar su porcentaje de 16.71%. De acuerdo con Centurión, no existe una diferencia con los resultados reportados en su estudio, ya que esta palma presenta un 24.19% de proteína cruda. Es imprescindible tomar en cuenta que las composiciones químicas de las palmas analizadas varían por varios factores, por ejemplo; el tipo de suelo en el que se cosecha, el uso de fertilizantes, el tamaño, la época del año, etc.

Con respecto a la elaboración del producto a base de harina de tepejilote en el análisis sensorial de la incorporación de la inflorescencia a las galletas se logró la aceptación del producto por parte de los participantes, calificándolo en un rango de 8 y 7, lo que significa “me gusta mucho” y “me gusta moderadamente” de acuerdo a la escala hedónica.

En relación con la composición química de las galletas marineras por cada 100g de galletas nos proporciona 364 kcal, 54 gramos de Hidratos de Carbono, 15 gramos de lípidos, 7 gramos de proteína y 4 gramos de fibra dietaria. En cuanto al aporte de micro nutrimentos nos proporciona un porcentaje de 17% de tiamina, 20% de Hierro y 91% de Ácido Fólico, entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castillo, J. J., Gallardo, N. R. & Johnson, D. V. (1994). The Pacaya Palm (*Chamaedorea tepejilote*, Arecaceae) and its food use in Guatemala. *Economic Botany* 48: 68-75.

2. Córdova, D. J., Dardón, J. R., González, J. E., Menéndez, L. M. (2009). Determinación y cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutricoséuticos. (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala.
3. CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Ca. nat. México. CONABIO, Mexico City
4. Centurión, H. D., Cázares, C. J. G., Espinosa, M. J., Poot-Matu, J. E. & Mijangos, C. M. A. (2003) Aprovechamiento alimentario de inflorescencias en la región sierra del Estado de Tabasco. México. Polibotánica. Núm.15 pp.89-97, ISSN 1405-2768.
5. Centurión, H. D., Espinosa, M. J., Lázaro, E. & Gómez, G. E. (2010) Contenido de Fibra Dietaria de Inflorescencias de Palmas Procesadas. Información Tecnológica Vol. 22 No 3 - 2011 doi: 10.4067/S0718-07642011000300002.
6. Granados-Sánchez, D. (2004). El cultivo de palma camedor (*Chamaedorea* sp.) en sistemas agroforestales de Cuichapa, Veracruz. Revista fitotec. Mex. 27(3), 233-241.
7. Hodel, R. D. (1992). *Chamaedorea* Palms. The International Palm Society, Lawrence. 1–338.
8. Meléndez, G. L., Trabanino, F. (2012). Tres perspectivas en torno al uso comestible de las inflorescencias de las palmas pacay(a) y chapay(a) en Chiapas, México: Enfoques paleoetnobotánico, nutricional y lingüístico. Estudios de Cultura Maya XLI.
9. Mendoza A., S. (1996). Evaluación de la palma camedor como recurso forestal en la región de la Chinantla (Oaxaca), México. (Tesis Licenciatura en Biología). Facultad de Ciencias UNAM. México. 95 pags.
10. Montejos- Ramos, O. (2012). Incorporación de la inflorescencia comestible de palma (*Arecaceae: Chamaedorea tepejilote* Liebm.). 6(1), 111-121.
11. Ramírez, F. 2001 La extracción de palmas camedoras en México: un grave riesgo de pérdida de diversidad biológica. Proyecto de Sierra de Santa Marta. Recuperado de https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57a08cf5e5274a27b200153b/R7925p_Palm_a_tepejilote_Santa_Cruz_Yagavila.pdf.
12. Riquett-Robles, D. (2013). Actividad hipoglucemiante de *Chamaedorea tepejilote* Liebm. (pacaya). Revista cubana de Plantas Medicinales, LACANDONIA 18(1), 23-33.
13. Sánchez-Machado DI, Núñez-Gastélum JA, Reyes-Moreno R, Ramírez- Wong B, López-cervantes BJ. (2010). Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. Food Analytical Methods 3: 175-180.