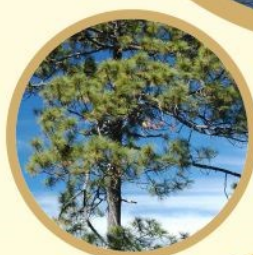




Biotecnia

Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud editada por la Universidad de Sonora



indexada en



IC Journal Master List

e-revist@s



Miembro de crossref

Pertenece al Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología del CONACYT



<http://biotecnia.unison.mx>

BIOTECNIA, 2022, 24, Número 1 (enero – abril), es una publicación electrónica cuatrimestral editada por la Universidad de Sonora, a través de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, con domicilio en Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col Centro, Hermosillo, Sonora, México, C.P.83000, página web: <https://www.biotecnia.unison.mx>, correo-e: biotecnia.difusion@unison.mx. Editor responsable del número: Enrique Márquez Ríos.

Reserva de Derechos al Uso Exclusivo 004-2022-061515171200-102. ISSN: 1665-1456; ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Se autoriza la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes en la presente publicación, siempre y cuando se cuente con la autorización del editor y se cite plenamente la fuente.



La revista Biotecnia se encuentra bajo la licencia Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)

Contenido

| Tipo | Páginas | Artículo |
|----------|------------|---|
| Original | pp 5-14 | Contaminación orgánica por coliformes, Nitrógeno y Fosforo en los ecosistemas acuáticos de la cuenca Ayuquila-Armería, Jalisco, México |
| Original | pp 15-22 | Caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) nativas y su efecto en el desarrollo del maíz (<i>Zea mays L.</i>) |
| Original | pp 23-29 | Elaboración y caracterización físico – mecánica de biocompuestos a base de harina de arroz y fibra de bagazo de caña |
| Original | pp 30-37 | Consortios de hongos micorrízicos y rizobacterias en el control biológico de <i>Phytophthora capsici</i> en cultivares de <i>Capsicum annuum</i> |
| Original | pp 38-45 | Estudio de actividad antibacteriana y toxicidad aguda de extracto acuoso estandarizado de fruto de <i>Randia monantha</i> Benth |
| Original | pp 46-54 | Identificación de compuestos bioactivos y características fisicoquímicas de la harina de cladodios de <i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Salm-Dyck |
| Original | pp 55-61 | Actividad citotóxica in vitro de los extractos de <i>Pinus durangensis</i> Martínez y <i>Quercus sideroxylla</i> Bonpl. |
| Original | pp 62-68 | Uso de cepas de <i>Pycnopus sanguineus</i> para la producción de enzimas con potencial uso en la industria de la panificación |
| Original | pp 69-78 | Evaluación de la interacción antioxidante de hidroxitolueno butilado y quercetina y su utilidad para la preservación de hamburguesas de carne de res |
| Original | pp 79-86 | Prevalencia y relación de mastitis con niveles séricos de vitaminas E y A y estatus microbiológico en vacas criollas doble propósito, en época de verano |
| Original | pp 87-96 | Efecto de diferentes relaciones de luz azul:roja en el crecimiento de plántulas de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) |
| Original | pp 97-106 | Uso de un diseño de mezclas para el desarrollo de hamburguesas de carne de bovino, con un perfil nutricional mejorado con harina de linaza, pulpa de mango y ciruela deshidratada |
| Original | pp 107-115 | Influencia de la separación de agua residual porcina en fracciones sólida y líquida, en la producción de metano con lodo anaerobio granular y disperso |
| Original | pp 116-121 | Uso de gel de Aloe vera en la producción de plántulas de <i>Capsicum chinense</i> |
| Revisión | pp 122-132 | Suplementos deportivos: ¿riesgo a la salud? |

- Original pp 133-141 Condiciones de maceración y fermentación que incrementan el contenido de etanol en mosto fermentado para whisky de malta
- Original pp 142-150 Aislamiento y caracterización de un aislado autóctono de *Beauveria* sp. de los campos cubanos
- Original pp 151-156 Impacto de la adición de L-cisteína en la masa de maíz nixtamalizado: proteínas y viscoelasticidad
- Original pp 157-163 Efecto de los sustratos en la producción de la biomasa de los granos de kéfir y la actividad antioxidante
- Original pp 164-170 Actividad de tres aceites esenciales sobre la mortalidad de *Rhizopertha dominica* (F.) en trigo almacenado

Contaminación orgánica por coliformes, Nitrógeno y Fósforo en los ecosistemas acuáticos de la cuenca Ayuquila-Armería, Jalisco, México

Organic contamination by coliforms, Nitrogen and Phosphorus in the aquatic ecosystems of the Ayuquila-Armeria basin, Jalisco, Mexico

Oscar Raúl Mancilla-Villa^{1*}, Larissa Gómez-Villaseñor², José Luis Olguín-Lopez², Rubén Darío Guevara-Gutiérrez², Omar Hernández-Vargas¹, Héctor Manuel Ortega-Escobar³, Héctor Flores-Magdaleno³, Álvaro Can-Chulim⁴, Edgar Iván Sánchez-Bernal⁵, Elia Cruz-Crespo⁴, Carlos Palomera-García²

¹ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa Sur, Departamento de Producción Agrícola. Av. Independencia Nacional #151 C.P. 48900, Autlán, Jalisco, México

² Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Ingeniería en Recursos Naturales y Agropecuarios. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa Sur, Av. Independencia Nacional #151 C.P. 48900, Autlán, Jalisco, México

³ Hidrociencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

⁴ Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit.

⁵ Universidad del Mar, Oaxaca Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Distrito de San Pedro, C.P. 70902. Pochutla, Oaxaca, México.

RESUMEN

La cuenca del río Ayuquila-Armería se encuentra dentro de la clasificación de cuencas prioritarias de México, dada su alta diversidad, alto grado de alteración de la dinámica funcional y los niveles de presión social que presenta, por ende, es necesario realizar un análisis de la calidad del agua dentro de la cuenca. El objetivo fue evaluar la contaminación orgánica, realizando dos periodos de muestreo en temporada de lluvia (2015), y seca (2016), en 18 sitios de la cuenca. Se implementó el análisis integral de variables físicoquímicas y biológicas. El 90 % de los sitios presento eutrofización dadas las concentraciones de P_{Total} ; el 77 % superó el límite permisible para las concentraciones de N_{Total} ; el IIB evidencio que el 19 % de los sitios presenta un alto grado de contaminación orgánica; en la temporada lluviosa se encontraron las mayores concentraciones de UFC (18 a 190 UFC/mL) y un 50 % de los sitios superó el límite permisible (10 UFC/mL). La influencia de los afluentes tributarios al cauce principal aumenta drásticamente en la temporada de lluvias, se incrementa los caudales y empobrece la calidad del agua superficial por el arrastre de contaminantes desde las zonas rurales y urbanas. **Palabras clave:** nutrientes, contaminación, macroinvertebrados, coliformes, Índice de Integridad Biótica.

ABSTRACT

The Ayuquila-Armería river basin is within the priority basins classification in Mexico, given its high diversity, and due to its high degree of functional dynamics alteration and levels of social pressure it presents; therefore, it is necessary to carry out an analysis of water quality within the basin. The objective was to evaluate organic contamination, carrying sampling campaigns in two seasons, one in the rainy (2015) and the other in the dry (2016) season, at 18 sites in the basin, through the implementation of a comprehensive analysis of physicochemical and biological variables. According to P_{Total}

concentrations, 90% of the sites presented eutrophication, exceeding 77% of them the permissible limit for N_{Total} concentrations. The IIB showed that 19% of the sites present a high degree of organic contamination, with highest CFU concentrations (18 to 190 CFU / mL) found in the rainy season and 50% of the sites exceeding the permissible limit (10 CFU / mL). The influence of tributary influents to the main channel increases drastically in the rainy season, increasing flows and impoverishes the surface water quality by pollutants carry-over from rural and urban areas.

Keywords: nutrients, pollution, macroinvertebrates, coliforms, biotic integrity index.

INTRODUCCIÓN

El recurso hídrico (agua) es uno de los elementos esenciales para la vida, y en los ecosistemas del planeta, ya que interviene en muchos de los procesos ambientales y está relacionado con su buen funcionamiento, esto propicia la generación de servicios ambientales de los que en gran medida depende la salud humana y el desarrollo económico de las naciones (Sierra, 2011). Más de dos terceras partes de la superficie de la tierra están cubiertas de agua, de la cual, 2.5 % es agua dulce en forma sólida en su mayoría (glaciares) o se encuentra en depósitos subterráneos, por lo que sólo 0.4 % de la misma está disponible para actividades humanas (Castro *et al.*, 2014), no obstante, esta mínima porción de agua dulce disponible, sufre cada vez más cambios negativos en las últimas décadas debido a las presiones humanas (Castillo y Vera, 2016).

Para este estudio el enfoque de cuenca es importante, ya que las cuencas hidrográficas son divisiones naturales del paisaje y para muchos propósitos componen el contexto idóneo para la planeación y gestión de los recursos naturales; su estructura y funcionamiento sustentan un equilibrio frágil y dinámico, producto de la interacción entre sus componentes,

*Autor para correspondencia: Oscar Raúl Mancilla Villa
 Correo electrónico: oscar.mancilla@academicos.udg.mx

Recibido: 15 de mayo de 2020

Aceptado: 20 de octubre de 2021

incluyendo las acciones antrópicas (Cotler *et al.*, 2010; Gerald *et al.*, 2010; Báez, 2014).

En Jalisco, la demanda de aguas superficiales está ligada al crecimiento poblacional y el desarrollo de actividades productivas (CONAGUA, 2016). La cuenca del río Ayuquila-Armería, es la más grande en el estado de Colima y la segunda en Jalisco, está dentro de la clasificación de las cuencas hidrográficas prioritarias de México por su alta biodiversidad, pero a la vez por su grado de alteración de la dinámica funcional y los niveles altos de presión social que presenta (Cotler *et al.*, 2010; Contreras-Rodríguez *et al.*, 2020).

La compleja problemática que presenta se debe a la contaminación de cuerpos de agua por sedimentos en suspensión, las descargas de drenajes urbanos a los cuerpos de agua, la modificación del entorno por una fuerte deforestación, el abatimiento de acuíferos en la parte media y baja de la cuenca, el desvío y la retención del agua que ocasionan el desecamiento de ríos y arroyos, el crecimiento demográfico, el uso ineficiente del agua urbana y agrícola, las especies introducidas de tilapia, el uso inadecuado de redes de pesca, la cacería furtiva y el cultivo de estupefacientes (Santana *et al.*, 1993; Mancilla-Villa *et al.*, 2017; Meza *et al.*, 2017).

Debido a la problemática y a la contaminación a la que se enfrenta el río, es necesario establecer un registro del análisis de la calidad del agua, haciendo énfasis sobre el aspecto de la contaminación orgánica. En este sentido, el presente estudio se enfoca en la evaluación de diversos parámetros de calidad del agua, considerando las concentraciones de nitratos, fosfatos, el contenido microbiológico y la aplicación de un índice de integridad biótica para evaluar el grado de contaminación orgánica. Los resultados se comparan con lineamientos nacionales (NOM-001-ECOL-1996.); además se complementa la información con la medición de parámetros fisicoquímicos como el pH, conductividad eléctrica (C.E.) y el caudal. Dándole un enfoque de importancia a las cuencas tributarias, las cuales dependiendo de su estado de calidad promueven el saneamiento o contaminación del cauce principal de la cuenca, se presentan recomendaciones para la mitigación de la contaminación hídrica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El río Ayuquila-Armería se localiza en los estados de Jalisco y Colima, en el occidente del país, entre las coordenadas geográficas 18° 51' 05" a 20° 28' 03" N y 104° 38' 17" a 103° 34' 41" O; cuenta con una extensión de 10257 km²; su origen por la confluencia de los ríos Ayuquila y del río Tuxcacuesco. Poco antes de ingresar al estado de Colima, toma el nombre de río Armería; recorre una distancia de 321 km desde la parte más alta (3290 msnm) hasta su desembocadura en el estero Boca de Pascuales en Colima (Cotler y Caire, 2009; Meza-Rodríguez *et al.*, 2017).

La cuenca es clasificada con clima semiseco muy cálido, cálido subhúmedo, semicálido subhúmedo y templado subhúmedo, todos con lluvias en verano; temperatura media anual de 14-28 °C; y una precipitación total anual de 700-

2000 mm, con evaporación del 80-90% de la precipitación total (Mancilla-Villa *et al.*, 2017). En cada sitio se determinaron las coordenadas geográficas mediante un GPS (Garmin, eTrex 10) (Figura 1).

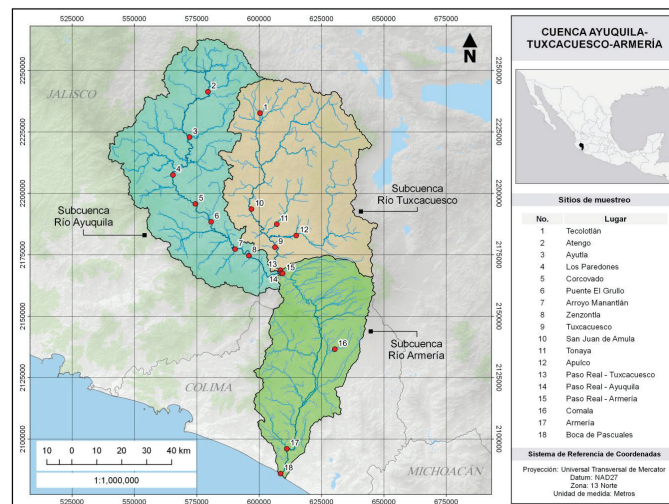


Figura 1. Localización geográfica de los sitios de muestreo en la cuenca del Río Ayuquila-Armería.

Figure 1. Geographical location of sampling sites at the Ayuquila-Armería River basin.

Muestreo y análisis

Se realizaron dos campañas de muestreos en la cuenca del Río Ayuquila-Armería y sus afluentes, abarcando la parte alta, media y baja de la misma, distribuyendo 18 sitios de colecta en la temporada de lluvia (octubre 2015) así como para la temporada seca (marzo 2016) (Figura 1). En cada sitio se colectaron muestras de agua (500 mL) y de macroinvertebrados acuáticos, aunado a esto se determinaron parámetros fisicoquímicos (pH, C. E y caudal).

Las muestras de agua se obtuvieron en cada uno de los puntos de muestreo utilizando recipientes de polietileno de alta densidad de 0.2 L, a cada envase se le colocó una etiqueta con su respectiva fecha, nombre y localización del sitio, posteriormente en laboratorio se determinó pH, conductividad eléctrica, nitratos y fosfatos (Solís-Garza *et al.*, 2011; Mancilla-Villa *et al.*, 2017).

Colecta de macroinvertebrados

La colecta de los macroinvertebrados se realizó con una red tipo D con una luz de malla de 600 µm, cubriendo las dos orillas del cauce y en dos muestreos en el centro para un total de 4 m² por sitio, los organismos colectados fueron contados in situ hasta obtener 120 individuos, posteriormente se colocaron en recipientes de plástico con alcohol al 70 % para ser transportados en hieleras e identificados en el laboratorio (Terneuz *et al.*, 2012; Gutiérrez-Garaviz *et al.*, 2014)

Los macroinvertebrados fueron agrupados como colector-filtrador, colector-recolector, raspadores, desmenuzadores y depredadores, de acuerdo con la clasificación de Merritt y Cummins (1996). Se calculó el Índice de Shannon-Wiener para conocer la diversidad de familias de cada sitio,

además, se analizó la tolerancia a la contaminación orgánica de cada familia por medio del Índice de Integridad Biótica (IIB) siguiendo la metodología de Henne *et al.* (2002) y Weigel *et al.* (2002) (Tabla 1). Los valores del índice van de 0 a 10, donde 10 es indicativo de alta concentración de nutrientes, por lo tanto, las comunidades estarán compuestas de especies cuya tolerancia a la contaminación orgánica varía de sensible a tolerante. Una vez puntuadas, las clasificaciones de calidad varían de excelentes a muy pobres en función de la probable cantidad de contaminación orgánica en el sitio muestreado (Tabla 2).

Tabla 1. Lista de macroinvertebrados y su valor de tolerancia para el análisis del Índice de Integridad Biótico (IIB).

Table 1. List of macroinvertebrates and their tolerance value for the analysis of the biotic integrity index (IIB).

| Phylum | Clase/Orden | Familia | Valor IIB | Grupo funcional |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|-----------|-----------------|
| Platyhelminthes | Turberllaria | | 4 | SH |
| Annelida | Oligochaeta | | 8 | SH |
| | Hirudinea | <i>Hirudidae</i> | 8 | SH |
| Decapoda | | <i>Cambaridae</i> | 6 | SH |
| | | <i>Palaemonidae</i> | 6 | SH |
| | | <i>Leptohyphidae</i> | 4 | CG |
| | Ephemeroptera | <i>Leptophlebiidae</i> | 2 | CG |
| | | <i>Baetidae</i> | 4 | CG |
| | | <i>Gomphidae</i> | 1 | PR |
| | | <i>Libellulidae</i> | 9 | PR |
| | Odonata | <i>Calopterygidae</i> | 5 | PR |
| | | <i>Coenagrionidae</i> | 9 | PR |
| | Plecoptera | <i>Perlidae</i> | 1 | PR |
| Hemiptera | <i>Naucoridae</i> | 5 | PR | |
| | <i>Belostomatidae</i> | 10 | PR | |
| Megaloptera | <i>Corydalidae</i> | 0 | PR | |
| | <i>Dryopidae</i> | 5 | SH | |
| Arthropoda | Coleoptera | <i>Dytiscidae</i> | 5 | PR |
| | | <i>Elmidae</i> | 4 | CG |
| | | <i>Psephenidae</i> | 4 | SC |
| | | <i>Pyrallidae</i> | 5 | SH |
| | Lepidoptera | <i>Hydropsychidae</i> | 4 | CF |
| | | <i>Philopotamidae</i> | 3 | CF |
| | Trichoptera | <i>Polycentropodidae</i> | 6 | CF |
| | | <i>Ceratopogonidae</i> | 6 | PR |
| | | <i>Simuliidae</i> | 6 | CF |
| | Diptera | <i>Tipulidae</i> | 6 | CG |
| <i>Empididae</i> | | 6 | CG | |
| <i>Tabanidae</i> | | 6 | PR | |
| <i>Chironomidae</i> | | 6 | CG | |

Grupos funcionales: CF: Colector-filtrador; CG: Colector-recolector; SC: Raspadores; SH: Desmenuzadores; PR: Depredadores. Fuente: Merritt y Cummins (1996); Henne *et al.* (2001); Weigel *et al.* (2002).

Tabla 2. Parámetros utilizados para el Índice de Integridad Biótico (IIB).
Table 2. Parameters used for the Biotic Integrity Index (IIB).

| IIB | Calidad | Grado de contaminación |
|-------------|----------------|---|
| 0.00 - 3.75 | Excelente | Ninguna contaminación orgánica aparente |
| 3.76 - 4.25 | Muy buena | Posible contaminación orgánica |
| 4.26 - 5.00 | Buena | Con alguna contaminación orgánica |
| 5.01 - 5.75 | Media | Contaminación orgánica bastante significativa |
| 5.76 - 6.50 | Bastante pobre | Contaminación orgánica significativa |
| 6.51 - 7.25 | Pobre | Contaminación orgánica muy significativa |
| 7.26 - 10.0 | Muy pobre | Contaminación orgánica severa |

Fuente: Henne *et al.* (2002).

Análisis microbiológico

El estudio bacteriológico en el agua de las microcuencas y el cauce principal se desarrolló de la forma siguiente: en frascos de polietileno de 500 mL, previamente lavados y esterilizados, se colectaron las muestras de agua de cada sitio; en su interior, previo a la esterilización, se colocó 0.1 cm³ de solución de disulfato de sodio al 1 % con el propósito de inhibir la acción del cloro que puede contener la muestra, cubriendo el tapón del frasco con papel aluminio como establece la NMX-AA-42 (1987) (Mora-Bueno *et al.*, 2012).

Las muestras de agua se llevaron al Laboratorio de Investigación en Biotecnología del Centro Universitario de la Costa Sur (CUCSUR) de la Universidad de Guadalajara para la realización de cultivos sobre placas Petrifilm EC para el recuento de *E. coli* / Coliformes que contiene nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias (Pucci *et al.*, 2013).

Sobre las placas Petrifilm se coloca 1 mL de muestra con pipetas esterilizadas, posteriormente se esparció uniformemente la muestra sobre la placa. Después de incubar las placas 24 hrs a 35 °C según método 991.14 del AOAC (2002), se contabilizan los puntos: los puntos azules son Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *E. coli* y los puntos rojos son colonias de coliformes fecales, que al sumarlas resulta en el total de colonias de coliformes (Redondo y Arias, 2011).

Estimación del caudal

Para la estimación del caudal se utilizó el método de las huellas máximas (Elosegui y Sabater, 2009) para cuantificar los volúmenes de aporte de las principales cuencas tributarias y del cauce principal. Por medio de este método se estimó el gasto máximo que se presenta durante una avenida reciente en un río donde no se cuenta con ningún otro tipo de aforo (Martínez y Fernández 2010). En la ecuación utilizada se tiene que:

$$Q=V \cdot A$$

Dónde: Q = Gasto de la avenida (m³/s) A = Área hidráulica en m². V = Velocidad (m/s).

Para obtener el área hidráulica, en cada punto de muestreo, se midió la profundidad que alcanza el cauce del río junto con la velocidad del caudal en cada metro a través del ancho total del caudal, una vez obtenidos estos dos parámetros se estimaron los volúmenes de aporte de cada sitio (De la Lanza *et al.*, 2012).

Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico para conocer la correlación entre muestreos realizados, se llevó a cabo análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre éstos. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 25.0. Adicionalmente se realizó un Análisis de Correspondencia canónica (ACC), para conocer la relación entre las variables fisicoquímicas del agua (pH, C.E y Caudal) y la presencia o ausencia de las familias de macroinvertebrados acuáticos. Para realizar este análisis se utilizó el software PC ORD V 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables fisicoquímicas

El valor de pH en la temporada lluviosa fluctuó entre 7.34 - 8.43 con un promedio de 7.98; en la temporada seca el valor fue entre 7.35 - 8.39 con un promedio de 7.84 (tabla 3); no se encontraron diferencias significativas entre las temporadas de muestreo (F= 1.51; p= 0.22) (tabla 4). Estos valores se consideran alcalinos (Díaz *et al.*, 2018) y se encuentran dentro del rango permisible (5 a 10 unidades) que establece la NOM-001-ECOL-1996, en su apartado de protección a la vida acuática. No obstante, se ha evidenciado que para utilizar el agua en el riego agrícola se recomiendan valores entre 5.5 y 6.5, ya que la mayoría de los iones se encontraran disponibles para la planta (Ortiz-vega *et al.*, 2019). Los valores de pH encontrados coinciden con los reportados en otros estudios realizados en la cuenca del río Ayuquila-Armería (Mancilla-Villa *et al.*, 2017), y en otras regiones del país (Guzmán-Colis *et al.*, 2011) lo que indica que existe poca variación temporal en cuanto al pH.

Los valores de C.E. fluctuaron de 137 a 2225 µS/cm en ambas campañas de colecta, los valores de 2225 y 2123 µS/cm corresponden al sitio de Boca de Pascuales, punto de desembocadura en el mar y es donde se combina el flujo de agua salada con la del río (tabla 3); no se encontraron diferencias significativas entre temporadas de muestreo (F= 0.21; p= 0.64) (tabla 4).

En este sentido los valores encontrados representan riesgo para la vida acuática en organismos de agua dulce en los sitios donde se superan los 1000 µS/cm, ya que se verían afectadas algunas de sus funciones vitales como la reproducción en algunas especies de peces (Meza y Sepúlveda, 2012). En cuanto al aspecto de riego agrícola estos valores representan riesgo en cuanto la utilización del recurso hídri-

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos determinados en los sitios de muestreo. **Table 3.** Physicochemical parameters determined at sampling sites.

| Sitio | pH | | C.E. (µS/cm) | | Caudal (m ³ /s) | |
|--------------|----------|-------|--------------|------|----------------------------|-------|
| | Lluviosa | Seca | Lluviosa | Seca | Lluviosa | Seca |
| Estación (n) | | | | | | |
| 1 | 7.88 | 7.72 | 122 | 137 | 0.17 | 0.03 |
| 2 | 7.34 | 7.35 | 158 | 149 | 1.24 | 0.44 |
| 3 | 7.79 | 7.59 | 182 | 187 | 3.67 | 1.02 |
| 4 | 7.7 | 7.61 | 155 | 143 | 26.96 | 16.14 |
| 5 | 7.9 | 7.87 | 162 | 162 | 27.03 | 16.32 |
| 6 | 7.59 | 7.42 | 172 | 182 | 8.29 | 3.82 |
| 7 | 7.48 | 7.46 | 56 | 112 | 4.13 | 1.37 |
| 8 | 8.18 | 8.29 | 195 | 221 | 43.41 | 14.46 |
| 9 | 8.11 | 8.12 | 419 | 423 | 32.89 | 11.49 |
| 10 | 7.77 | 7.43 | 333 | 347 | 5.56 | 1.80 |
| 11 | 8.44 | 8.28 | 504 | 513 | 0.34 | 0.03 |
| 12 | 8.43 | 8.41 | 235 | 246 | 0.29 | 0.03 |
| 13 | 8.07 | 8.01 | 432 | 427 | 30.08 | 9.37 |
| 14 | 7.99 | 7.55 | 286 | 279 | 45.19 | 19.99 |
| 15 | 8.04 | 7.71 | 379 | 385 | 75.26 | 29.67 |
| 16 | 8.12 | 7.99 | 233 | 244 | 1.07 | 0.29 |
| 17 | 8.4 | 7.87 | 573 | 561 | 59.06 | 18.40 |
| 18 | 8.35 | 8.39 | 2225 | 2123 | 58.34 | 16.93 |
| Promedio | 7.98 | 7.84 | 378 | 380 | 23.50 | 8.98 |
| Desv Std | 0.326 | 0.353 | 482 | 455 | 24.40 | 9.18 |

co, ya que los valores de restricción se establecen al superar los 1000 µS/cm (Can-Chulim *et al.*, 2014). Se ha evidenciado que valores que exceden los 1500 µS/cm presentan efectos negativos sobre la germinación de algunas semillas, como el maíz (*Zea Mays*) donde el porcentaje de germinación de las semillas disminuyó al utilizar aguas con una C.E. por arriba de los valores antes mencionados (Fessel *et al.*, 2006; Viloria *et al.*, 2011).

En cuanto a los resultados de la medición del caudal, en la primera campaña de muestreo las determinaciones variaron de 0.18 a 75.27 m³/s con un promedio de 23.50 m³/s. En la segunda campaña los valores oscilaron entre 0.03 a 29.68 m³/s con un promedio de 8.98 m³/s. Para este parámetro sí se encontraron diferencias significativas entre las temporadas de muestreo (F= 5.58; p=0.024) (tabla 4). Los valores más altos (> 15 m³/s) corresponden a las mediciones realizadas en los cauces principales, y los valores más bajos (< 15 m³/s) corresponden a las mediciones realizadas en los afluentes del mismo cauce.

El caudal del río se considera como un factor muy importante ya que este influye directamente en la variación de los niveles de parámetros fisicoquímicos y en las concentraciones de contaminantes orgánicos (Guevara *et al.*, 2006; Encalada, 2010). La relación del caudal con la concentración de algunos contaminantes se ha puesto en evidencia en estudios como el de Gaete *et al.* (2007), en el cual se demostró que los niveles de contaminantes; coliformes y Nitrógeno,

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) para ambas campañas de muestreo.
Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for both sampling campaigns.

| Determinaciones | | Suma de cuadrados | GI | Media cuadrática | F | p sig. |
|--------------------|------------------|-------------------|----|------------------|------|--------|
| pH | Entre grupos | 0.175 | 1 | 0.17 | 1.51 | 0.22 |
| | Dentro de grupos | 3.91 | 34 | 0.11 | | |
| | Total | 4.09 | 35 | | | |
| C.E. | Entre grupos | 0.04 | 1 | 0.004 | 0.21 | 0.64 |
| | Dentro de grupos | 0.68 | 34 | 0.20 | | |
| | Total | 0.69 | 35 | | | |
| Caudal | Entre grupos | 1897.69 | 1 | 1897.69 | 5.58 | 0.024* |
| | Dentro de grupos | 11551.74 | 34 | 339.75 | | |
| | Total | 13449.43 | 35 | | | |
| UFC | Entre grupos | 7453.44 | 1 | 7453.44 | 4.36 | 0.044* |
| | Dentro de grupos | 58112.44 | 34 | 1709.19 | | |
| | Total | 65565.88 | 35 | | | |
| P _{Total} | Entre grupos | 0.019 | 1 | 0.019 | 0.11 | 0.73 |
| | Dentro de grupos | 5.55 | 34 | 0.16 | | |
| | Total | 5.57 | 35 | | | |
| N _{Total} | Entre grupos | 647.70 | 1 | 647.70 | 1.04 | 0.031* |
| | Dentro de grupos | 21118 | 34 | 321.12 | | |
| | Total | 21766 | 35 | | | |

Diferencia significativa ($p \leq 0.05$) *

disminuían cuando el caudal en el Río Aconcagua llegaba a sus puntos máximos y al contrario se encontraron mayores concentraciones de estos en los meses donde el caudal disminuía. En otro estudio en el río Condoto en Colombia, se evidenció que las concentraciones de contaminantes provenientes de las zonas urbanas y mineras disminuían cuando por la estacionalidad aumentaba el caudal del río, y en contraparte se encontraron mayores concentraciones de contaminantes cuando el caudal disminuía (Sánchez y Cañón, 2010).

Las concentraciones de fósforo total (P_{Tot}) se clasificaron de acuerdo con los valores de peligro de eutrofización de cuerpos de agua propuesta por Sharpley (2010), la cual indica que una concentración mayor a 0.1 mg/L de P disuelto puede causar la eutrofización acelerada de las aguas.

En la figura 2, se muestra la concentración de P_{Total} de las aguas superficiales en ambas campañas de muestreo y el límite que representa el peligro de eutrofización acelerada. No se encontró variación en la concentración de P en las dos temporadas, excepto en El Corcovado, donde se presentó en temporada lluviosa una concentración de 0.01 y en temporada seca una concentración de 0.48 mg L⁻¹.

Fregoso-Zamorano (2015) en la misma zona de estudio registró una concentración de 0.02 mg/L de P en El Corcovado en el mes de octubre del 2013, valor que aumentó a 0.5 mg/L en marzo del 2014, demostrando que existe una constante de que en la temporada lluviosa la concentración en El Corcovado disminuye para después aumentar en la temporada seca. En general, las aguas del río Ayuquila-

Tuxcacuesco-Armería contienen poca cantidad de fósforo que pueden aportar a los cultivos sin ocasionar problemas, pero en la mayoría de los sitios el fósforo contenido acelera el proceso de eutrofización en las aguas. Las actividades antropogénicas, como la utilización de grandes cantidades de detergentes y fertilizantes, aportan fósforo a las aguas superficiales y aceleran este proceso (Neal *et al.*, 2006).

Se han realizado otros estudios referentes a la determinación de fósforo y sus diferentes formas en aguas superficiales y subterráneas. Tal es el caso del estudio desarrollado en el sistema hidrográfico Zahuapan-Atoyac por Carrera-Villacrés *et al.* (2011), donde se encontró que las concentraciones de P y PO_4 , en los orígenes de los ríos Zahuapan y Atoyac son

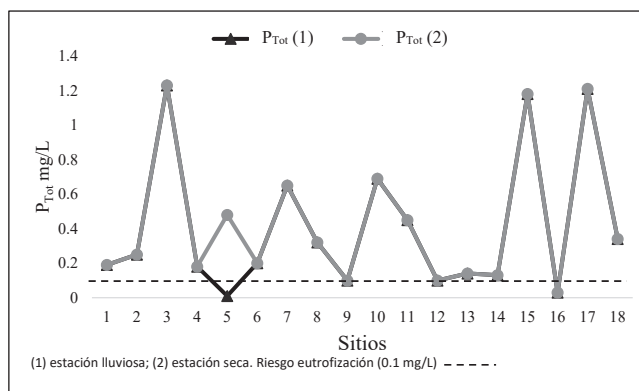


Figura 2. Concentración de P_{Total} en los sitios muestreados en la estación lluviosa y seca.

Figure 2. P_{Total} concentration at sampled sites in the rainy and dry season.

bajas, de 0.3 a 0.5 mg/L. En cambio, cuando los cauces de estos ríos ingresan por poblados urbano-industriales, las concentraciones aumentan considerablemente y varían de 1.0 a 7.89 mg/L. Los resultados se asemejan a los encontrados en el presente estudio y se infiere que esta semejanza es el resultado de la influencia de las condiciones ambientales que atraviesa el río Ayuquila-Armería, el cual transita por zonas industriales y urbanas, donde las aguas residuales no reciben tratamiento alguno.

En la figura 3, se presentan las concentraciones de N_{Total} en ambas campañas de muestreo (estación lluviosa y seca) y su comparación con el límite permisible de concentración relativo a la protección de la vida acuática (25 mg/L) propuesto por la NOM-001-ECOL-1996. Se encontraron diferencias significativas entre temporadas de muestreo ($F= 1.04$; $p=0.031$) (tabla 4). El 50 % de los sitios muestreados supera el límite permisible, las concentraciones más altas se encontraron en la temporada lluviosa en los sitios 4 y 18.

Las variaciones de concentración de N_{Total} en el muestreo de la temporada lluviosa y seca, encontradas en las aguas de los sitios muestreados se relacionan con la descarga de aguas residuales agrícolas, que derivan de la aplicación de fertilizantes nitrogenados, así como de las descargas de aguas residuales provenientes de granjas porcícolas y aguas residuales urbanas sin tratamiento como se ha evidenciado en otros trabajos de investigación realizados en la región de estudio (Palomera-García, 2012; Mancilla-Villa *et al.*, 2017).

En un estudio realizado en el río Zahuapan, México por Muñoz-Nava *et al.* (2013) encontraron que los promedios de concentración de N_{Total} en las doce microcuencas estudiadas no fueron mayores a 15 mg/L, la concentración más elevada fue de 11.5 mg/L; estos resultados se atribuyen a un posible efecto de la presa de Atlangatepec y a la capacidad de retención de nutrientes de la vegetación acuática que se encuentra en el cauce del río. Los resultados encontrados difieren a los del presente estudio. En base a los estudios realizados se puede inferir que la vegetación ribereña tiene un papel muy importante en cuanto a la retención de contaminantes (Rodríguez-Contreras *et al.*, 2020), situación que se ve reflejada el estado de la condición ecológica de las riberas de la cuenca del río Ayuquila-Armería.

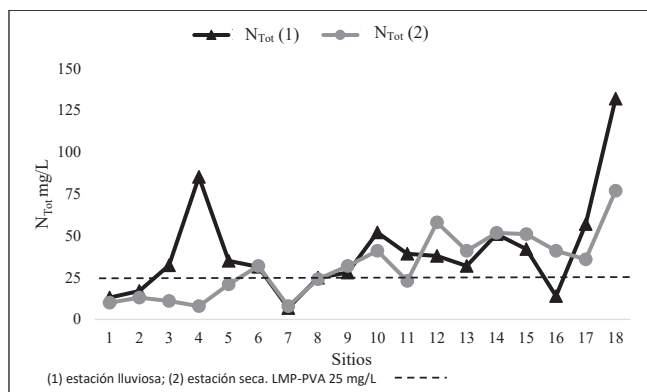


Figura 3. Concentración de N_{Total} en los sitios muestreados en la estación lluviosa y seca.
Figure 3. N_{Total} concentration at sampled sites in the rainy and dry season.

Índice de integridad biótica

Se colectaron e identificaron un total de 2634 macroinvertebrados, 1878 en temporada lluviosa pertenecientes a 20 familias, y 756 en temporada seca pertenecientes a 20 familias, en 18 sitios del área de estudio (figura 4). La familia más abundante fue Leptopheibidae con 729 individuos colectados en las dos temporadas, le sigue la familia Hydropsychidae con 630 individuos. En general se colectaron más especímenes en la temporada lluviosa que en la temporada seca, esto coincide con lo reportado en otros estudios en la zona (Palomera-García, 2012; Hernández-Vargas *et al.*, 2017).

En cuanto a la diversidad en los sitios, los valores de diversidad varían de 0.04 a 2.20 en ambas temporadas (figura 5), que coincide con el rango registrado por Palomera-García (2012) en un estudio realizado en la cuenca del río Ayuquila –Tuxcacuesco – Armería, donde registró un rango de diversidad de 0.19 a 2.19. El sitio con mayor diversidad (H') fue Arroyo Manantlán (sitio 7) en las dos temporadas muestreadas (2.20 en temporada lluviosa y 2.12 en temporada seca), sin embargo, en general no existe un patrón en los sitios que indique en cual temporada aumenta o disminuye la diversidad.

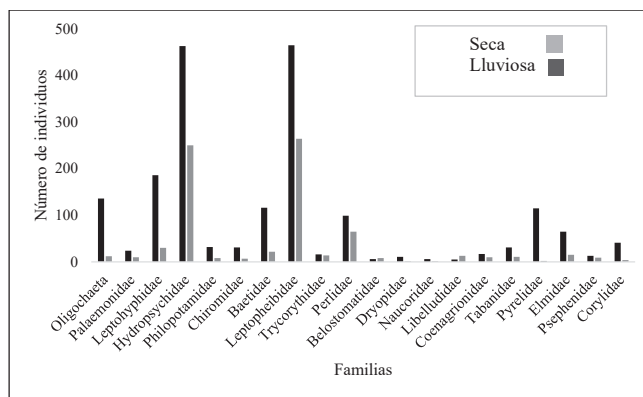


Figura 4. Número de individuos colectados por familia en ambas temporadas de muestreo.
Figure 4. Number of individuals collected per family at both sampling seasons.

En la figura 5 se presentan los resultados obtenidos de la aplicación del índice de integridad biótica (IIB). En la temporada de lluvias, de acuerdo con Henne *et al.* (2002), los sitios con calidad excelente ($IIB < 3.5$) sin ninguna contaminación orgánica aparente, representaron el 69 % de los sitios. No hay sitios con buena calidad, otro 6 % corresponde a sitios de calidad buena, otro 6 % es de calidad media y le siguen los sitios de calidad pobre con un 13 % y por último los sitios de calidad muy pobre ($IIB > 6.5$) representan el 6 % del total.

Los sitios con calidad excelente en la temporada seca representaron el 47 %; el 29 % de los sitios fueron de calidad muy buena; los sitios de calidad buena representaron el 18 %; le siguieron los sitios de calidad media con un 6 % del total; no se presentaron sitios con calidad pobre o muy pobre.

En general, hay una mayor cantidad de sitios con calidad excelente en la temporada lluviosa que en la seca, no obstante, también hay más sitios con calidad pobre o muy

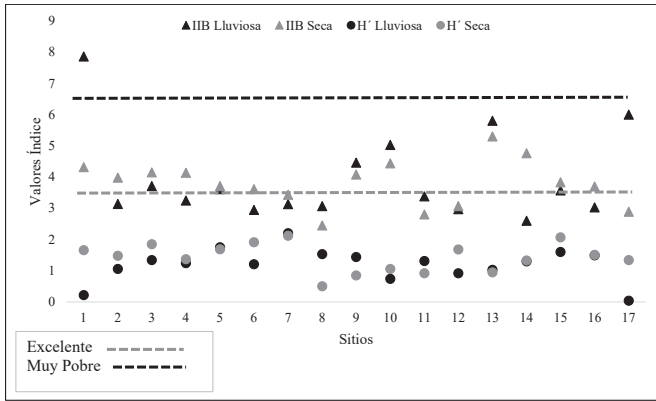


Figura 5. Índices de integridad biótica y diversidad por temporada de muestreo. IIB= índice de integridad biótica, H’= índice de Shannon-Wiener. **Figure 5.** Biotic integrity and diversity indices per sampling season. IIB = biotic integrity index, H’ = Shannon-Wiener index.

pobre en esta misma temporada. Los resultados concuerdan con lo registrado por Palomera-García (2012), quien registró una mayor cantidad de sitios de excelente y muy buena calidad de acuerdo con su IIB en la temporada de lluvias.

El análisis de correspondencia canónica (figura 6), indica que la varianza acumulada de la relación entre la presencia de las comunidades biológicas y las variables ambientales seleccionadas se explica en los dos primeros ejes con un 63 %. En aquellos sitios con los valores más altos de caudal, se encuentra la familia Perlidae, esta familia de macroinvertebrados tiene una relación positiva con el caudal y se considera una de las familias con mayor grado de sensibilidad a la contaminación orgánica (Merrit y Cummins 1996).

Por su parte la variable de P_{Total} presenta una relación positiva sobre la familia Leptopheibidae, los valores de P_{Total} fueron bastante homogéneos entre las dos temporadas y no existe alta variabilidad entre sitios. La variable de N_{Total} tiene relación con las familias Baetidae e Hydropsychidae, estas tienen mayores facilidades de adaptación y por lo tanto son los más tolerantes a efectos de condiciones extremas o de perturbación (Moya *et al.*, 2011; Roldan-Pérez, 2016). Se puede apreciar mediante este análisis de correspondencia, que las comunidades biológicas se están separando entre sitios y entre temporadas de muestreo, lo anterior es el resultado de la misma estructura de las comunidades de macroinvertebrados y la correlación con las variables ambientales.

Análisis microbiológico

En la figura 7 se presenta la cuantificación de UFC en los sitios del Río Ayuquila y sus afluentes por temporada de muestreo. Estos resultados se comparan con el límite permisible (10 UFC/mL) propuesto por la NOM-001-ECOL-1996. El 50 % de los sitios exceden el límite permisible en la estación lluviosa, con concentraciones que van desde los 18 UFC/mL hasta 190 UFC/mL; por otra parte, en la estación seca el 22 % de los sitios superan el límite permisible, con concentraciones que oscilan entre 11 y 21 UFC/mL. Se encontraron diferencias significativas entre las temporadas de muestreo ($F= 4.36$; $p= 0.044$) (tabla 4).

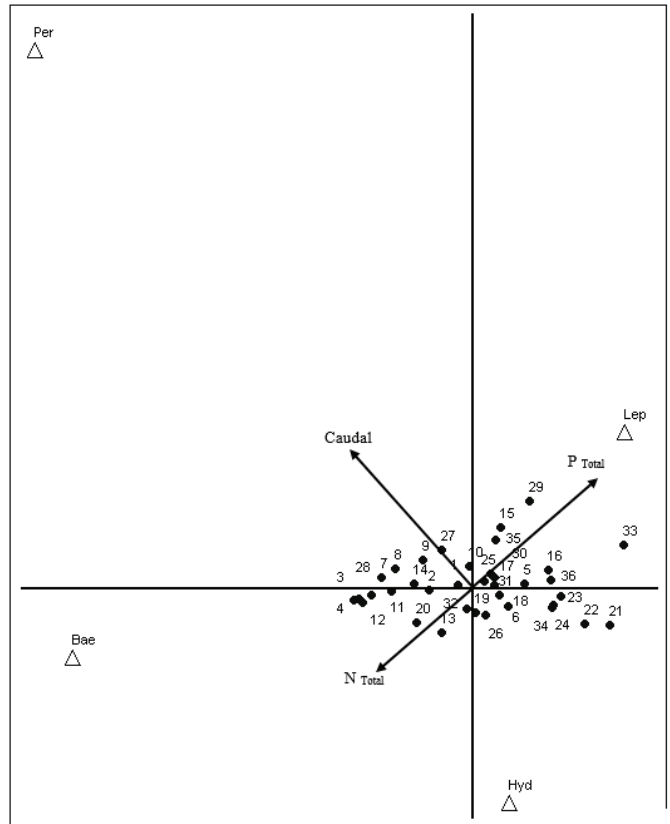


Figura 6. Análisis de correspondencia canónica en el ordenamiento de los sitios muestreados en ambas temporadas, relacionado con la presencia y abundancia de las familias de macroinvertebrados [Leptopheibidae (Lep), Baetidae (Bae), Perlidae (Per) e Hydropsychidae (Hyd)], colectados por sitio y correlacionado con las variables ambientales (P_{Total} , N_{Total} y caudal). **Figure 6.** Canonical correspondence analysis in the sampled sites ordering in both seasons, related to the presence and abundance of the macroinvertebrate families [Leptopheibidae (Lep), Baetidae (Bae), Perlidae (Per) and Hydropsychidae (Hyd)], collected by site and correlated with environmental variables (P_{Total} , N_{Total} and caudal).

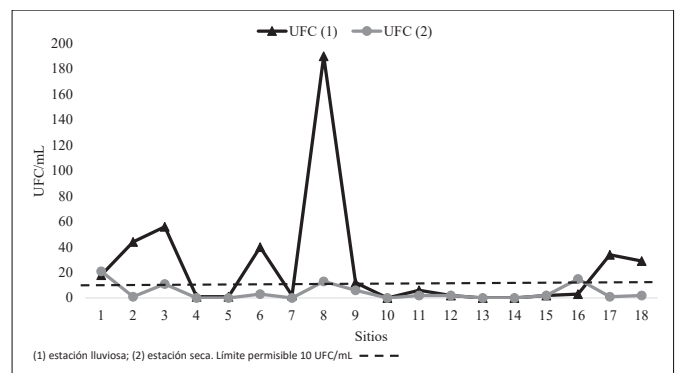


Figura 7. Concentración de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) por temporada en los sitios muestreados. **Figure 7.** Colony forming units concentration (CFU / mL) per season at the sampled sites.

El arrastre de residuos por la acción de la lluvia eleva las concentraciones de coliformes en la mayoría de los sitios, situación que se ve reflejada al encontrarse mayores concentraciones de UFC en la temporada lluviosa, esto se ha evidenciado en otros estudios (Ramírez *et al.*, 2009; Olguín *et al.*, 2010). Por otra parte, se les suman a las descargas provenientes de granjas porcícolas, las descargas de aguas residuales urbanas, tomando como referencia que en México el 70 % de los municipios cuentan con planta de tratamiento de agua residual, y de estas, alrededor del 50 % se encuentre en funcionamiento actualmente (CONAGUA, 2016).

El sitio que registró la mayor concentración de UFC fue el número 8 en la temporada de lluvias. Se infiere que estas concentraciones se deben a que, en este punto del río se vierten las aguas residuales de los municipios de Autlán y El Grullo, así como todo el arrastre de las lluvias del suelo agrícola del valle Autlán – El Grullo. En general las concentraciones aumentan en todos los sitios en la temporada de lluvias, debido a la descarga de aguas negras de áreas urbanas y drenaje agrícola, lo que sugiere una alta y peligrosa contaminación por patógenos intestinales (Robles *et al.*, 2013; Anduro *et al.*, 2017).

Por otro lado, los sitios 4 y 10, son sitios que se encuentran poco después de dos presas importantes en la región (Trigomil y Las Piedras), lo que sugiere una mayor dilución del agua y, por tanto, menos concentración de coliformes (Sardiñas *et al.*, 2006). El caso del sitio 7 corresponde al Arroyo Manantlán, este es un afluente el cual tiene su nacimiento en la parte alta de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, por ende, este afluente sufre muy poca o nula presión y contaminación urbana, por lo tanto, se considera como un sitio de referencia de buena calidad microbiológica (Santana *et al.*, 1993).

Un estudio realizado por Olivas-Enríquez *et al.* (2011) en el Río Bravo determinó la concentración de coliformes totales y *E. coli*. La presencia indiscutible de enteropatógenos en el agua del Río Bravo constituye un riesgo para la salud pública, principalmente para los agricultores que la manejan, y en el riego por la contaminación de los productos agrícolas de consumo humano, así como para las personas que entran en contacto con el agua del río.

CONCLUSIONES

Se confirmó que existe alto riesgo de eutrofización en los cuerpos de agua analizados debido a las altas concentraciones de **Fósforo total** (P_{Total}) y Nitrógeno Total (N_{Total}). Esto sugiere tomar acciones preventivas y correctivas en la disminución de la contaminación por estos elementos y analizar la supervisión de las actividades antropogénicas que emanan contaminantes fosfóricos y nitrogenados. El índice de integridad biótica mostró alta contaminación orgánica en 20% de los sitios en estudio, es un porcentaje relevante debido a que las actividades antropogénicas son las causas principales de esta problemática. Se demuestra que urge un plan estratégico a nivel cuenca para evitar los derrames, vertederos o lixiviados de contaminantes orgánicos. Estos

hallazgos explican la problemática que debe atenderse con estrategias que generen alternativas de manejo de recursos hídricos e insumos agropecuarios con enfoques sustentables y que eviten descargas y arrastres de bacterias peligrosas para la salud humana y ecosistémica.

REFERENCIAS

- Anduro, J., Cantú, S y Campos B. 2017. Diagnóstico de la calidad sanitaria del agua de pozo en comunidades del sur de Sonora, México. *Revista Salud Publica y Nutrición*. 16(1):1-8.
- AOAC. 2002. AOAC Official method 991.14 coliform and *Escherichia coli* counts in foods. AOAC International. Washington, D.C.
- Báez, W. 2014. Análisis del manejo de cuencas como herramienta para el aprovechamiento sustentable de recursos naturales. *Revista Chapingo, Serie Zonas Áridas*. 13(2): 39-45.
- Can-Chulim, A., Ortega-Escobar, H. M., Sánchez-Bernal, E. I., y Cruz-Crespo, E. 2014. Calidad de agua para riego en la Sierra Norte de Puebla, México. *Tecnologías y Ciencias del Agua*. 5(5): 77-96.
- Castro, M., Almeida, J y Díaz, D. 2014. Indicadores de la calidad del agua: evolución y tendencias a nivel global. *Ingeniería solidara*. 10(17): 111-124.
- Castillo, O. y Vera, R. 2016. Agua potable y saneamiento en la nueva ruralidad de América Latina. Serie Agua para el desarrollo, Bogotá-Colombia, 500 pp.
- Carrera-Villacrés, D., Ortega-Escobar, H., Ramírez-García, J., Ramírez-Ayala, C., Trejo-López, C y Becerril-Román, A. 2011. Boro, fosfatos e índices de salinidad del sistema hidrográfico Zahuapan-Atoyac, México. *Tecnología y ciencias del agua*. 2(2): 05-21.
- Díaz, R., Duarte, H., Pallanez, M., Moreno, J., Mejía, J y Durazo, F. 2018. Análisis de los criterios para proteger la vida acuática: el río Sonora después del derrame minero de 2014. *Aqua-LAC*. 10 (1): 75-87.
- CONAGUA. 2016. Estadísticas del agua en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Ciudad de México, México, 282 pp.
- Cotler, H. y Caire, G. 2009. Lecciones aprendidas del manejo de cuencas en México. Instituto Nacional de Ecología (INE), Fundación Gonzalo Río Arronte, I.A.P., WWF, la Organización Mundial de Conservación.
- Cotler, H., A. Garrido, V. Bunge y M. L. Cuevas. 2010. Las cuencas hidrográficas de México: priorización y toma de decisiones. En Cotler A. H. 2010. Las cuencas hidrográficas de México. Diagnóstico y priorización. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 120 pp.
- Contreras-Rodríguez, F., Martínez-Rivera, L. y Ortiz-Arrona, C. 2020. Nivel de alteración ecohidrológica en ríos perennes de la cuenca del río Ayuquila-Armería. *Biotecnia*. 22(2): 28-38.
- De la Lanza, G., Carbajal, J., Salinas, S y Barrios, J. 2012. Medición del caudal ecológico del río Acaponeta, Nayarit, comparando distintos intervalos de tiempo. *Investigaciones geográficas*. 78: 62-74.
- Elósegui, A. y Sabater, S. 2009. Conceptos y técnicas en ecología fluvial. *Boletín de la Real Sociedad de Geografía*. 145: 374-375.
- Encalada, A. 2010. Funciones ecosistémicas y diversidad de los ríos: Reflexiones sobre el concepto de caudal ecológico y su aplicación en el Ecuador. *Revista Polémika*. 2(5): 40-47.

- Fessel, S., Vieira, R., Cruz, M y Panobianco, M. 2006. Pruebas de conductividad eléctrica de semillas de maíz según la temperatura y el período de almacenamiento. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 41 (10), 1551-1559.
- Fregoso-Zamorano, B. 2015. Calidad de las aguas de riego de la cuenca del río Ayuquila-Tuxcacuesco-Armería. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Guadalajara. Autlán de Navarro, Jalisco, México. 136 pp.
- Gaete, H. F., Aranguiz, G., Cienfuegos y M. Tejos. 2007. Metales pesados y toxicidad de aguas del río Aconcagua en Chile. *Química Nova*. 30: 885-891.
- Geraldi, A., Piccolo, M. y Perillo, G. 2010. Delimitación y estudio de cuencas hidrográficas con modelos hidrológicos. *Investigaciones geográficas*. 52: 215-225.
- Guevara, E. 2006. Análisis de frecuencia y riesgo en hidrología. Manuscrito Dirección General de Postgrado, Universidad de Carabobo.
- Gutiérrez-Garaviz, J., Zamora, H. y Andrade, S. 2014. Efecto de la actividad antrópica sobre la composición y diversidad de macroinvertebrados acuáticos en el río Cofre (sistema lótico andino colombiano). *Revista Biodiversidad Neotropical*. 4 (2): 113-123.
- Guzmán-Colis, G., Tthalasso, F., Ramírez-López, E., Rodríguez-Narciso, S., Guerrero-Barrera, A y Avelar-González, F. 2011. Evaluación espaciotemporal de la calidad del agua del río San Pedro en el estado de Aguascalientes, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 27(2): 89-102.
- Henne L.J., Schneider D.W. y Martínez-Rivera L.M. 2002. Rapid assessment of organic pollution in a west-central Mexican river using a family-level biotic index. *Journal of Environmental Planning and Management*. 45 (5), 613-632.
- Hernández-Vargas, O. 2017. Calidad del agua de dos cuencas tributarias del Río Tuxcacuesco, Jalisco. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de la Costa Sur. Autlán de Navarro, Jalisco, México. 159 pp.
- Mancilla-Villa, O. R., Fregoso-Zamorano, B. E., Hueso-Guerrero, E. J., Guevara-Gutiérrez, R. D., Palomera-García, C y Olguín-López, J. L. 2017. Concentración iónica y metales pesados en el agua de riego de la cuenca de río Ayuquila-Tuxcacuesco-Armería. *IDESIA*. 35(3): 115-123.
- Martínez, M., y Fernández, R., D. 2010. Hidrología aplicada a las pequeñas obras hidráulicas. SAGARPA. Colegio de Posgraduados. 20 pp.
- Merritt R.W. y Cummins K.W. 1996. An introduction of the aquatic insects of North America. 3a Ed. Dubuque: Kendall/Hunt. Michigan, EUA, 862 pp.
- Meza, S., Sepúlveda, S. 2012. Efecto de la conductividad eléctrica y nivel del agua sobre la reproducción de la trucha xenocara (*Ancistrus triradiatus*, Eigenmann 1918) bajo condiciones experimentales. *Veterinaria e Zootecnia*. 6(1): 37-46.
- Meza-Rodríguez, D., Martínez-Rivera, L. M., Mercado-Silva, N., García de Jalón-Lastra, D., González del Tánago-Del Río, M., Marchamelo-Sacristán, M. y De la Mora-Orozco, C. 2017. Régimen natural de caudales del río Ayuquila-Armería en el occidente de México. *Terra Latinoamericana*. 35: 203-217.
- Mora-Bueno, D., Sánchez-Peña, L., Del Razo, L. M., González-Arias, C., Medina-Díaz, I., Robledo-Marenco, M y Rojas-García, A. 2012. Presencia de arsénico y coliformes en agua potable del municipio de Tecuala, Nayarit, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28(2): 127-135.
- Moya, N., Domínguez, E., Goitia, E. y Oberdoff, T. 2011. Desarrollo de un índice multimétrico basado en macroinvertebrados acuáticos para evaluar la integridad biológica en ríos de los valles interandinos de Bolivia. *Asociación Argentina de Ecología; Ecología Austral*. 21(2): 7-20.
- Muñoz-Nava, H., Suárez-Sánchez, J., Vera-Reyes, A., Baumann, J., Carreón-Coca, M. y Montealegre-Muñoz, R. 2013. Relación entre el nitrógeno y las microcuencas del río Zahuapan, México. *Tecnología y ciencias del agua*. 4(4): 47-61.
- Neal, C., House, W. A., Jarvie, P. H., Neal, M., Hill, L. y Wickham, H. 2006. The water quality of the river Dunn and the Kennet and Avon canal. *Journal of Hydrology*. 330: 155-170.
- NORMA MEXICANA. 1987. NMX-AA-42-1987, Calidad del agua-determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. Diario Oficial de la Federación, México.
- Olguín, E., González-Portela, R., Sánchez, G., Zamora, G y Owen, T. 2010. Contaminación de ríos urbanos: El caso de la subcuenca del río Sordo en Xalapa, Veracruz, México. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 1(2):178-190.
- Olivas-Enríquez, E., Flores-Margez, J. P., Serrano-Alamillo, M., Soto-Mejía, E., Iglesias-Mejía, J., Salazar-Sosa, E. y Fortis-Hernández, M. 2011. Indicadores fecales y patógenos en agua descargada al Río Bravo. *Terra Latinoamericana*. 29(4): 449-457.
- Ortiz-Vega, M. I., Can-Chulim, Á., Romero-Bañuelos, C. A., Cruz-Crespo, E y Madueño-Molina, A. 2019. Calidad del agua para uso agrícola del río Mololoa, México. *Terra Latinoamericana*. 37: 185-195
- Palomera-García, C. 2012. Effects of land-use activities in the Ayuquila River's fauna (Tesis doctoral). Simon Fraser University, Canada. 179 pp.
- Pucci, G., Acuña, J y Pucci, H. 2013. Contaminación microbiológica por enterobacterias y coliformes totales de la playa de Stela Maris, Comodoro Rivadavia, Argentina, derivada de los efluentes cloacales. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 13 (5): 1102-1107.
- Ramírez, E., Robles, E., Sainz, G y Ayala, R. 2009. Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25(4): 247-255.
- Redondo, M. y Arias, M. 2011. Comparación de métodos para el análisis de coliformes totales y fecales en muestras de agua mediante la técnica de Número Más Probable (NMP). *UNED Research Journal*. 3(2): 41-43.
- Robles, E., Ramírez, E., Durán, A., Martínez, M y González, M. 2013. Calidad bacteriológica y fisicoquímica del agua del acuífero Tepalcingoaxochiapan, Morelos, México. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 4 (1): 19-28.
- Roldan-Pérez, G. 2016. Los macroinvertebrados como bioindicadores de la calidad del agua: cuatro décadas de desarrollo en Colombia y Latinoamérica. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 40(155): 254-274.
- Santana E., Navarro S., Martínez L.M., Aguirre A., Figueroa P. y Aguilar C. 1993. Contaminación, aprovechamiento y conservación de los recursos acuáticos del río Ayuquila, Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco-Colima. *Tiempos de Ciencia*. 30: 29-38.

- Sánchez, D., y Cañón, J. 2010. Análisis documental del efecto de vertimientos domésticos y mineros en la calidad del agua del río Condoto (Chocó, Colombia). *Gestión y Ambiente*. 13(3): 115-130.
- Sardiñas, O., Chiroles, S., Fernández, M., Hernández, Y y Pérez, A. 2006. Evaluación fisicoquímica y microbiológica del agua de la presa El Cacao (Cotorro, Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*. 6: 202-206.
- SEMARNAT. 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales, en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación. 23 de abril de 1995. Ciudad de México, México, 35 pp.
- Sharpley, A. 2010. Manejo de fósforo en sistemas de producción agrícola ambientalmente sostenible: desafíos y oportunidades. *Informaciones Agronómicas*. 15-23.
- Sierra C.A. 2011. *Calidad del agua, evaluación y diagnóstico*. Universidad de Medellín. Medellín, Colombia, 456 pp.
- Solís-Garza, G., Villalba-Atondo, A. I., Nubes-Ortiz, G., Del Castillo-Alarcón, J. M. y Meraz-Acosta, F. A. 2011. Físicoquímica del agua superficial y sedimento en el río Santa Cruz, Sonora, México. *Biotecnia*. 13 (1), 3-9.
- Terneus, E., Hernández, K y Racines, M. 2012. Evaluación ecológica del río Lliquino a través de macroinvertebrados acuáticos, Pastaza-Ecuador. *Revista de Ciencias*. 16: 31-45.
- Viloria, H.; Méndez-Natera, J.R. 2011. Relación entre la conductividad eléctrica, pH del agua de remojo, germinación de semillas y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) bajo dos condiciones experimentales. *Scientia Agropecuaria*. 2(4): 213-228.
- Weigel B.M., Henne L.J., Martínez-Rivera L.M. 2002. Macroinvertebrate-based index of biotic integrity for protection of streams in west-central Mexico. *Journal of North American Benthological Society*. 21(1), 686-700.

Characterization of native plant growth-promoting bacteria (PGPB) and their effect on the development of maize (*Zea mays* L.)

Caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) nativas y su efecto en el desarrollo del maíz (*Zea mays* L.)

Carlos Fernando Amezcua-Aviles¹, Claudia Brizeida Coronel-Acosta¹, Sergio de los Santos-Villalobos¹, Gustavo Santoyo², Fannie Isela Parra-Cota^{3*}

¹ Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México

² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

³ Campo Experimental Norman E. Borlaug-INIFAP. Norman Borlaug km 12, Cd. Obregón, Sonora, México.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most important cereals for Mexico and humanity. The Yaqui Valley -located at the northwest of Mexico- is one of the most important agricultural regions worldwide, it is characterized by an indiscriminate use of inorganic fertilizers for improving crop yields, leading to an increased environmental and economic cost of maize production. This work carried out a morphological, metabolic, and molecular characterization of native bacteria associated with maize rhizosphere, evaluating the positive effects of bacterial inoculation on plants under greenhouse conditions. The evaluated strains were taxonomically affiliated -based on the 16S rRNA gene- as *Bacillus* sp. (13B41), *Advenella incenata* (22A67), *Pantoea dispersa* (22B45), and *Rhizobium pusense* (31B11). All these strains were able to synthesize indoles, produce siderophores, and solubilize phosphates. The individual inoculation of these strains to maize plants showed a significant increment (compared to un-inoculated plants) in height (35-40 %), shoot dry weight (244-289 %), root dry weight (99-137 %), and SPAD values (40- 47 %). The native bacteria associated with maize in the Yaqui Valley are a promising alternative to promote the growth of their host plant and contribute to a sustainable maize production.

Keywords: microbial inoculants, plant growth promotion, soil, greenhouse.

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más importantes para México y la humanidad. El Valle del Yaqui -ubicado en el noroeste de México- es una de las regiones agrícolas más importantes a nivel mundial, se caracteriza por un uso indiscriminado de fertilizantes inorgánicos para mejorar el rendimiento de los cultivos, lo que genera un mayor costo ambiental y económico de la producción de maíz. En este trabajo se realizó una caracterización morfológica, metabólica y molecular de bacterias nativas asociadas a la rizósfera del maíz y se evaluaron los efectos positivos de la inoculación bacteriana en plantas de maíz bajo condiciones de invernadero. Basándose en la secuencia del gen del 16S ARNr las cepas evaluadas se afiliaron taxonómicamente como *Bacillus* sp. (13B41), *Advenella incenata* (22A67), *Pan-*

toea dispersa (22B45) y *Rhizobium pusense* (31B11). Todas estas cepas pudieron sintetizar indoles, producir sideróforos y solubilizar fosfatos. La inoculación individual de estas cepas en maíz mostró un incremento significativo (en comparación con plantas no inoculadas) en altura (35-40 %), peso seco de brotes (244-289 %), peso seco de raíces (99-137 %) y valores SPAD (40-47%). Las bacterias asociadas al maíz nativas del Valle del Yaqui son una alternativa prometedora para promover el crecimiento de su planta hospedante y contribuir a una producción de maíz sostenible.

Palabras clave: inoculantes microbianos, promoción del crecimiento vegetal, suelo, invernadero.

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) belongs to the group of cereals with worldwide importance, due to its applications in animal consumption, including human. In 2018, world maize production reached 1147.62 million tons, the highest amount among the main cereals (FAO, 2020). In Mexico, during 2018, around 7.3 million hectares were cultivated with this cereal, with a total production of 27.1 million tons (SIAP-SADER, 2020). On the other hand, maize production in the main agricultural zones of northwestern Mexico, such as the Yaqui Valley, reached 449,000 tons in the year 2018, while in 2019 its production increased up to 567,000 tons (SIAP-SADER, 2020). However, this global and national food demand has led to the indiscriminate use of agrochemicals, in areas of intensive agriculture such as the Yaqui Valley, where high amounts of nitrogen and phosphate fertilizers have been used, as well as pesticides, to improve the yield of several crops such as wheat and maize (McCullough and Matson, 2016). Nevertheless, the excessive use of agrochemicals contributes to the contamination of soils and underground water supplies, leading to potential health risks and environmental degradation (Meza-Montenegro *et al.*, 2012). Thus, the need for the development of sustainable strategies for food production, to diminish the damage caused by the use of large quantities of agrochemicals, is evident.

The use of soil microorganisms (mainly bacteria) as inoculants with beneficial traits for plant development and soil health represents an attractive alternative to conven-

*Autor para correspondencia: Fannie Isela Parra Cota
 Correo electrónico: parra.fannie@inifap.gob.mx

Recibido: 28 de junio del 2021

Aceptado: 28 de octubre de 2021

tional agriculture, named Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2019). PGPB includes a large group of microorganisms that can be found in the rhizosphere and bulk soil, as well as within and on aerial plant tissues (de Souza *et al.*, 2015). PGPB applied to plants, either on soil or seeds, improve plant crops growth and protection against diseases and abiotic stress, by improving the biological nitrogen fixation, solubilization of phosphates, reduction of stress through diverse enzyme production, synthesis of phytohormones, production of siderophores, among others (Glick, 2012; de Souza *et al.*, 2015). Thus, the most studied genera of PGPB are *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, and *Rhizobium* (Glick, 2012; Ahemad and Kibret, 2014). Several studies have demonstrated the ability of these bacterial genera to promote the growth of different crops such as rice, tomato, wheat, maize, chickpea, peanuts, among others, showing significant changes in physiological parameters, *i.e.*, dry weight, chlorophyll content, and plant height (Kumar *et al.*, 2014; Sharon *et al.*, 2016).

PGPB can be classified as native or indigenous when those are endemic to the site where they will be applied and as exogenous when they are isolated from other locations. Several research, mainly related to pollutants biodegradation, have shown that for an exogenous PGPB to properly perform its functions, not only must adapt to the local region edaphoclimatic conditions but also there must be compatibility with the native microorganisms (*i.e.* to avoid competence for nutrients or a specific niche). For example, Festa *et al.* (2016) found that the inoculation of exogenous microorganisms caused significant changes in the diversity of the microbial community, which can compromise the subsequent functionality of the soil. On the other hand, Kaur and Reddy (2013) demonstrated that native bacterial strains associated with maize crop have the ability to facilitate microorganism-plant interaction in order to enhance plant growth parameters, such as shoot length, germination, shoot, and root dry weight, as well as an increase in crop yield, by the production of phytohormones, siderophores, and solubilization of phosphates. However, the bacterial inoculant success in the field is not assured, due to the influence of several important factors such as climatic conditions, native microbiota, and its formulation (Dutta and Podile, 2010; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018). The introduction of exogenous PGPB could induce at least a transient perturbation of the equilibrium of soil microbial communities, this may be undesirable if important native species are lost, affecting subsequent crops (Trabelsi and Mhamdi, 2013). However, this effect could be buffered by ecosystem resilience, which is driven by the level of diversity and interactions of the plant-soil-biota (Kennedy, 1999).

At present, research works on native microbiota in the Yaqui Valley are very scarce (de los Santos-Villalobos *et*

al., 2018), even when this is the birthplace of the Green Revolution, and there are no microbial inoculants developed with native strains from this area, which have adapted to the edaphoclimatic conditions (high temperatures, alkaline and low content of organic matter). The aim of this study was to identify and characterize promising native PGPB associated with maize in the Yaqui Valley, as well as to quantify their inoculating impact on morphometric parameters of maize, grown under greenhouse conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

The studied bacterial strains (22A67, 13B41, 22B45, and 31B11) were selected according to their ability to promote *in vitro* maize growth (unpublished data). These strains are cryopreserved in Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA, www.itson.mx/COLMENA) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018). Glycerol-frozen (-80 °C) bacterial strains were pre-cultured in Petri dishes containing Nutrient Agar (NA) as a culture medium, and incubated for 24 h at 28 °C.

Morphological and molecular characterization

All bacterial strains were cultured in Nutrient Agar (NA) and incubated for 24 h at 28 °C to characterize them by macro (color, shape, margins, and elevation) and microscopical (Gram stains and shape) traits. DNA from each strain axenic bacterial culture was extracted using the UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (QIAGEN®), the DNA integrity analyzed by 1% agarose electrophoresis while the quality and concentration by spectrophotometry (NanoMicro-Spectrophotometer Jenway®). To amplify the 16S rRNA gene (1500bp) we used the FD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') and RD1 (5'-CCC GGGATCCAAGCTTAAGGAGGT-GATCCAGCC-3') primers (Weisburg *et al.*, 1991), in a 50 µL PCR reaction mixture containing 100 ng DNA, 1X PCR buffer, 0.2 µM primers, and 4U MyTaq DNA polymerase (Bioline). The PCR cycle was as follows: 5 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 30 s at 95 °C, 40 s at 57 °C, 2 min at 72 °C, and a final elongation step of 5 min at 72 °C. PCR products were verified by electrophoresis gel agarose/TAE (2 %), and the purified amplicons sequenced by the Sanger platform. The edition and analysis of the obtained DNA sequences was with the software FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA), CLC Sequence viewer 7 (QIAGEN, Denmark), and BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) used to identify the reported sequence with greater similarity to the studied bacterial strains. The phylogenetic analysis was generated with the MEGA software version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) using the neighbor-joining method, the evolutionary distances computed using the Tamura 3-parameter model. The partial sequences of the 16S rRNA gene were deposited in the Genbank database (MG807394, MG807395, MG807396, MG807397 accession numbers).

Plant growth promoting traits by bacterial strain

Indoles production. For quantification of indoles production, 1×10^3 Colony Forming Units (CFU) of each bacterial strain were inoculated, in triplicate, into 30 mL of nutrient broth (NB), supplemented with 100 ppm of tryptophan, and incubated in a rotary shaker (Yamato®) at 150 rpm and 28 °C for 3 days. After incubation, the bacterial culture was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and 1 mL of the supernatant was placed in a 1.5 mL Eppendorf tube and centrifuged again at 8000 rpm for 10 min according to de los Santos-Villalobos *et al.* (2013). Quantification of indoles was performed by the spectrophotometric method using Salkowski reagent according to Glickmann and Dessaux (1995). The concentrations of produced indoles were estimated with a standard curve of indole-3-acetic acid (Sigma®), in a range of 2-50 ppm. The tests were carried out in triplicate.

Phosphate solubilization. Each bacterial strain (1×10^3 CFU) was inoculated, in triplicate, on Petri dishes containing Pikovskaya (PVK) medium and incubated at 25 °C for 10 days. The PVK medium was composed of 2 solutions (salts and bromophenol blue Stock) according to Onyia and Anyanwu (2013). The ability of the studied strains to solubilize phosphorus (P) was observed by a transparent halo around the bacterial colony. The Phosphate solubilization index (PSI) was obtained according to Sharon *et al.* (2016), following the Equation 1:

$$\text{Phosphate solubilization or siderophore production index} = \frac{(\text{Halo zone} + \text{Colony diameter})}{\text{Colony diameter}}$$

Equation 1. Phosphate solubilization index or Siderophore production index

Siderophore production. To determine the ability of studied bacterial strains to produce siderophores, 1×10^3 CFU of each strain was inoculated on Petri dishes containing chrome azurol S medium (CAS), and incubated at 28 °C for 10 days, by three independent replicates (García-Meléndez *et al.*, 2017). The CAS medium preparation was following the method described by Alexander and Zuberer (1991). Strains that showed a transparent or colored halo around the bacterial colony were positive for this test. The siderophore production index was obtained following the Equation 1.

1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate(ACC) deaminase activity. The ability of strains to produce ACC deaminase was screened in Petri dishes containing minimal medium according to Dworking and Foster (1958). 1×10^3 CFU of each strain was inoculated, by triplicate, in Petri dishes containing minimal media with ACC as its sole nitrogen source; then incubated at 28 °C for 3 days. Bacterial growth in the minimal medium was considered positive in ACC deaminase activity (nutrient medium was used as control).

In all the characterization tests mentioned above, *Bacillus* sp. P41B2 whose plant growth promoting traits are known was used as technical control.

Maize growth promotion by studied PGPB under greenhouse conditions

Bacterial production. A bacterial pre-inoculum was prepared for each strain (1×10^5 UFC), in tubes with 25 mL of Nutrient Broth (NB), incubated at 120 rpm for 24 h at 28 °C. Then, the pre-inoculum optical density adjusted to $OD_{630} = 0.5$ (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2019). For the bacterial inoculum, 1 mL of pre-inoculum was inoculated to 3 L of NB, and incubated for 72 h, at 28 °C with shaking at 120 rpm. The bacterial suspension was pelleted by centrifugation for 15 min at 4000 rpm, washed twice and finally re-suspended in sterile distilled water. The bacterial concentration (CFU/mL) was adjusted to 1×10^9 CFU/mL.

Greenhouse assay. The greenhouse assay was carried out in 4 L pots under greenhouse conditions at the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) located at Cajeme, Sonora (27°N, 110°W). The max/min temperature during assay was 30 °C/8 °C and 12-hour photoperiod. CARIBU® (ASGROW®) commercial hybrid maize was used. A non-sterile mixture of perlite/agricultural soil/Pro-Mix GTX® substrate (1:3:2) was used as a plant substrate. The soil mixture was classified as clay-loam, with the following characteristics: organic matter = 5.48 %, pH in $CaCl_2 = 7.07$, electrical conductivity = 2.903 dS/m, total salts = 1858 ppm, N = 217 Kg/Ha, P = 15 ppm. In each pot, 300 mL (1×10^9 CFU/mL) of each bacterial strain were applied separately to each plant, 10 replicates per treatment and an un-inoculated control were established. Plants were kept well-watered, and no chemical fertilizers were applied during the assay (Parra-Cota *et al.*, 2014).

Measurement of maize growth parameters. Data collection was weekly over 6 weeks and at the end of the assay (42 days after sowing). The first measurement was 14 days after sowing between stages V3 and V4 of maize growth. Plant height, leaf chlorophyll level (SPAD 502 Minolta®), and leaves number were measured, and at the end, height, plant and root dry weight, and stem thickness.

Statistical analysis

A completely randomized design was applied in all experimental assays with three replicates per treatment, in the greenhouse assay a replicate was constituted by 10. Data analysis was by one-way analysis of variance (ANOVA) test and Tukey-Kramer test ($p=0.05$), using Statgraphics Centurion XVI.II (Statgraphics Technologies, Inc., Virginia).

RESULTS AND DISCUSSION**Morphological and molecular characterization of studied bacterial strains**

The macroscopic traits of all strains were similar in shape (circular), margin (entire), and elevation (flat) but different colors. Cell shape varied from coccus for strain 22A67 to rod-shaped for the other strains. Similarly, Gram stain was different between the bacterial strains (Table 1). Based on the 16S rRNA gene sequence phylogenetic analysis (Figure 1), the identifications were as follows: strain 22A67 as *Advenella incenata* (MG807395, accession number), strain 22B45

Table 1. Morphological characteristics of studied PGPB.
Tabla 1. Características morfológicas de las BPCV estudiadas.

| Strain | Macroscopic traits | | Microscopic traits | |
|--------|--------------------------------------|-------------|--------------------|---------------|
| | Morphological traits | Color | Cell shape | Gram reaction |
| 13B41 | Circular with entire margin and flat | Brown | Rod-shaped | Positive |
| 22A67 | Circular with entire margin and flat | Light Brown | Coccus | Negative |
| 22B45 | Circular with entire margin and flat | Yellow | Rod-shaped | Negative |
| 31B11 | Circular with entire margin and flat | Brown | Rod-shaped | Negative |

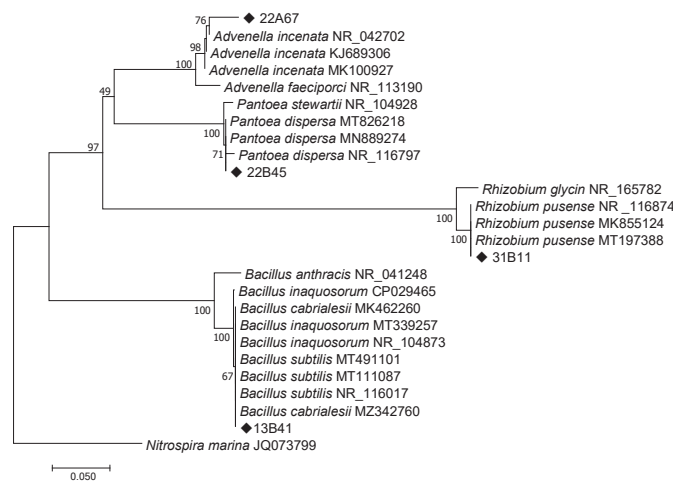


Figure 1. Phylogenetic Tree inferred using the Neighbor-Joining method. Numbers at nodes indicate values of bootstrap support based on an analysis of 1,000 resampled data sets. *Nitrospira marina* was used as an outgroup sequence. The scale bar indicates the number of base substitutions per site.
Figura 1. Árbol filogenético inferido mediante el método de *Neighbor-Joining*. Los números en los nodos indican valores de soporte de bootstrap basados en un análisis de 1000 conjuntos de datos remuestreados. Se utilizó *Nitrospira marina* como secuencia externa. La barra de escala indica el número de sustituciones de bases por sitio.

as *Pantoea dispersa* (MG807397), strain 31B11 as *Rhizobium pusense* (MG807394), and the strain 13B41 (MG807396) as *Bacillus* sp. In the latter, it was not possible to determine the species due to the sequences high similarity between different species of the genus *Bacillus*.

The four genera to which the studied bacterial strains belong have been previously described as PGPB. The *Bacillus* genus was first reported by Cohn in 1872 and currently includes more than 377 species, which are widely distributed in very diverse ecosystems such as aquatic, terrestrial, and those with extreme conditions (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018; de los Santos Villalobos *et al.*, 2019). Several *Bacillus* species have been identified as plant growth-promoting bacteria since they suppress pathogens and/or improve plant development (Sansinenea, 2019). Bacteria of the *Rhizobium* genus have been extensively studied for their ability to fix nitrogen in symbiosis with legumes, but *Rhizobium* is also a

very good root colonizer of non-legumes and can produce plant hormones, siderophores, solubilize phosphorus, and exhibits adverse effects to plant pathogens (Qureshi *et al.*, 2013). At present, many research works have demonstrated the beneficial effects of *Rhizobium* inoculation to cereals, like maize, in terms of improved growth and yield (Mehboob *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2016).

Pantoea is a relatively recent genus, proposed by Gavini *et al.* (1989). *Pantoea* spp. have been isolated from plants surfaces, within plant tissues, seeds, fruits, rhizosphere, water, soil, from humans and other animals; they are rarely considered as pathogens (Chauhan *et al.*, 2015). Various studies have reported strains of *Pantoea* as biological control agents and as growth promoter in crops such as corn, wheat, apple, cotton, barley, and potato (Montañez *et al.*, 2012; Kaur and Reddy, 2013; Chauhan *et al.*, 2015). Whereas the genera mentioned above has been widely studied, mainly *Bacillus* and *Rhizobium*, *Advenella* is a poorly studied genus, and reports of their role as PGPB are scarce, but these coincide in their potential role as phosphate solubilizers in soils with crops such as maize and wheat (Espinosa-Victoria *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020).

Plant growth promoting traits by studied bacterial strains

In order to have a better understanding of plant-microorganism interactions, it is important to study the PGPB potential mechanisms of action. The four studied strains were able to produce indoles, *i.e.*, *Pantoea dispersa* 22B45 showed the higher production of indoles (11 ppm), followed by *Bacillus* sp. 13B41 (4.0 ppm), *Rhizobium pusense* 31B11 (3.8 ppm), and *Advenella incenata* 22A67 (2.8 ppm) (Table 2). Indole acetic acid (IAA) is generally considered as the most important native auxin (Glick, 2012); several species of bacteria are capable to produce this class of phytohormones, where their production vary depending on growing conditions, stage of development, availability of nutrients, among others (Duca *et al.*, 2014). The bacteria indoles production can affect the hormonal balance in plants and, therefore, can influence their growth, mainly increasing the total root surface, which leads to an enhanced mineral uptake from the soil (Spaepen and Vanderleyden, 2011). For example, in different studies, two native *Pantoea* strains associated with maize showed the ability to synthesize indoles in 121.6 ppm and 93 ppm, respectively (Montañez *et al.*, 2012; Kaur and Reddy, 2013). Similarly, Naveed *et al.* (2014) demonstrated that indoles-producing bacteria application can positively affect different growth parameters of maize, such as root dry weight and plant height, with increments of 43% and 8%, respectively, compared to un-inoculated control.

On the other hand, *Advenella incenata* 22A67 showed a high level of phosphate solubilization in PVK medium, similar to an *Advenella* strain with phytase activity reported by Singh (2014). *Pantoea dispersa* 22B45, *Bacillus* 13B41, and *Rhizobium pusense* 31B11, also showed the ability to solubilize phosphates, but at a lower level (Table 2). P is an

Table 2. Plant growth promotion traits by studied PGPB, under *in vitro* conditions.

Tabla 2. Rasgos de promoción del crecimiento vegetal de las PGPB estudiadas, en condiciones *in vitro*.

| Strain | Indoles production (ppm) | Phosphate solubilization Index (PSI) | Siderophore production Index (SPI) | ACC deaminase activity |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. 13B41 | 4.0 ^b | 1.25 ^{ab} | 1.88 ^b | - |
| <i>Advenella incenata</i> 22A67 | 2.8 ^a | 1.58 ^b | 1.40 ^a | - |
| <i>Pantoea dispersa</i> 22B45 | 11.4 ^c | 1.42 ^{ab} | 1.29 ^a | + |
| <i>Rhizobium pusense</i> 31B11 | 3.8 ^b | 1.15 ^a | 1.30 ^a | + |
| <i>Bacillus</i> sp. P41B2* | 3.1 ^{ab} | 1.28 ^{ab} | 1.37 ^a | - |

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test), $n=3$. (+)= Production, (-)= No production. *= Technical control

important nutrient of plants due to it is involved in different functions, such as photosynthesis, respiration, and nutrient movement (Viruel *et al.*, 2014). There is enough P in soil, but only a small amount is available for plants, which limits their growth (Viruel *et al.*, 2014). The P availability depends on its solubility, which is influenced by the activity of roots and microorganisms in the soil, mainly through the production of organic acids and alternate mechanisms as the production of chelating compounds and secretion of phytase enzymes (Pande *et al.*, 2017). Thus, the studied strains can be classified as phosphate-solubilizing bacteria capable of solubilizing phosphate from an insoluble tricalcium source, which has shown a positive impact on biomass weights of tomato and maize crops, compared to un-inoculated plants (Montañez *et al.*, 2012; Sharon *et al.*, 2016).

Another important micronutrient for plants is iron (Fe), which influences several important biological processes such as photosynthesis, respiration, and chlorophyll synthesis (Kobayashi and Nishizawa, 2012). However, like phosphorus, this micronutrient has low availability in soils. Soil bacteria can overcome this Fe limitation by chelating molecules called siderophores (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018), which production capacity provides an advantage against soil-borne pathogens (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012). Every studied strains showed the ability to produce siderophores, observing the higher value (SPI=1.88) for *Bacillus* sp. 13B41, significantly different compared to the rest of the strains (Table 2). In addition, bacterial genera like *Pantoea*, *Advenella*, *Bacillus*, and *Rhizobium* have shown this biochemical trait, also related to the growth promotion effect in maize and wheat cultivars (Kaur and Reddy, 2013; Kumar *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014).

The activity of the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, is of a plant growth promoter

mechanism by microorganisms, which regulate plant levels of ethylene (Glick, 2012). Ethylene is produced endogenously by plants and participates in the regulation of all processes for their growth, however, under environmental stress, its production is accelerated, negatively affecting root growth, and therefore, the development of the whole plant (de Souza *et al.*, 2015). Here, *Pantoea dispersa* 22B45 and *Rhizobium pusense* 31B11 showed ACC activity, like that reported by Shahzad *et al.* (2008), where strains of the genus *Pantoea* were identified with ACC activity and used to increase the yield of chickpea of up to 54 % compared to the un-inoculated control. Hussain *et al.* (2016) showed that by the inoculation of *Rhizobium* in maize, plants grew under drought stress conditions, obtaining an increase of 16 % and 30 % in dry biomass of root and shoot, respectively, compared to un-inoculated plants.

Maize growth promotion by isolated bacterial strains, under greenhouse conditions

In this study, all inoculated treatments showed a significant difference ($p \leq 0.05$) in plant chlorophyll level compared to the un-inoculated treatment, increased up to 40 % by *Bacillus* sp., 47 % by *Rhizobium pusense*, 41 % by *Pantoea dispersa*, and 39% by *Advenella incenata* at 42 days after sowing (Figure 1). However, there was no significant difference between plants inoculated with the studied strains. At 14 days after sowing, plant chlorophyll levels increased from 13 % to 20 % for all inoculated plants compared to the un-inoculated treatment (Figure 2). Increased chlorophyll content by the application of PGPB might be attributed to the enhanced root size of plants by phytohormones production, as well as the solubilization and mobilization of nutrients (Qasim *et al.*, 2017). Furthermore, the leaf chlorophyll level is markedly related to the photosynthetic capacity, which implicates a better nutrient cycling, indicating an improvement of plant growth (Croft *et al.*, 2016).

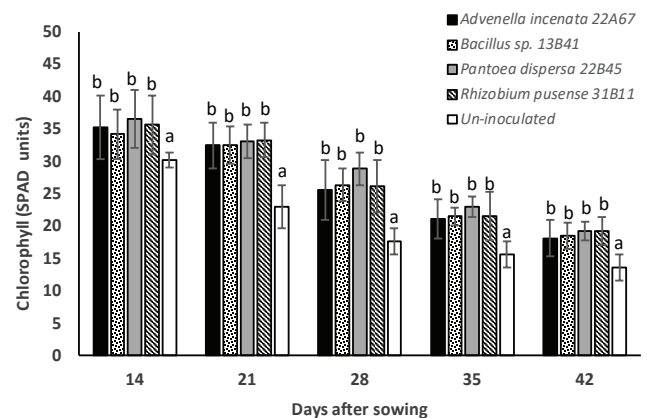


Figure 2. Chlorophyll level of maize plants inoculated by each studied strain and un-inoculated. Distinct letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey test), $n=10$.

Figura 2. Nivel de clorofila de plantas de maíz no inoculadas e inoculadas por cada cepa estudiada. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$, prueba de Tukey), $n=10$.

Height of inoculated plants showed significant differences at 21 days after sowing, where strain *Advenella incenata* 22A67 showed a height of 37 cm, being different to the rest of the treatments [30.2 cm, 30.9 cm, 31.5 cm, and 28.2 cm for *Pantoea dispersa* 22B45, *Rhizobium pusense* 31B11, *Bacillus* sp. 13B41, and un-inoculated control, respectively]. The plant height on days 28, 35, and 42 after sowing, showed significant increases for all treatments (40, 51, and 35 %, respectively), compared to the un-inoculated treatment, and there was no difference between plants inoculated with the studied strains, as indicated in Figure 3.

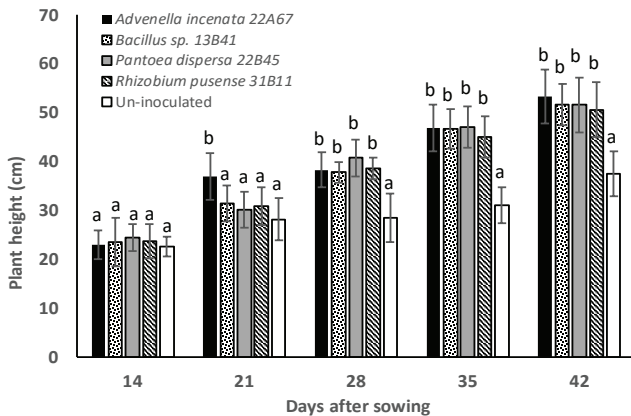


Figure 3. Height of maize plants inoculated with each strain. Distinct letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey Test), $n = 10$.
Figura 3. Altura de las plantas de maíz inoculadas con cada cepa. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$, prueba de Tukey), $n = 10$.

In addition, the stem thickness showed a significant increment from 63% to 73% by studied bacterial strains (Table 3), compared to the un-inoculated treatment. This increment may relate to the accumulation of reserves in the stem during the vegetative stages, which could later increase the production of grains (Setter and Meller 1984; Seyed Sharifi *et al.*, 2017). On the other hand, the maize inoculation of the studied strains increased the number of leaves, but *Pantoea dispersa* 22B45 increased the number of leaves by 33 %, presenting at least one more leaf per plant than the rest of the strains and un-inoculated control (Table 3). Agbodjato *et al.* (2016) and Abiala *et al.* (2015) also reported an increase in the number of leaves in maize plants inoculated with PGPB under greenhouse conditions; in the first study the effect was observed by the inoculation of *P. fluorescens*; while in the second, the individual inoculation of *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Citrobacter* and *Enterobacter* caused this effect in plants. The increase in the number of leaves is clear evidence of the growth promoting effect generated by the PGPB.

Maize plants inoculated with *Pantoea dispersa* 22B45 also showed the highest root dry weight, 6.34 g, followed by maize inoculated with *Bacillus* sp. 13B41, *Rhizobium pusense* 31B11, *Advenella incenata* 22A67, and un-inoculated plants, as shown in Table 3. All inoculated plants showed a higher shoot dry weight and root dry weight compared to the un-inoculated treatment, with increments from 244 to 289 %,

Table 3. Effect of studied PGPB on maize growth under greenhouse conditions, at vegetative stage V8.

Tabla 3. Efecto de las PGPB estudiadas sobre el crecimiento del maíz en condiciones de invernadero, en la etapa vegetativa V8.

| PGPB | Stem thickness (mm) | Number of leaves | Root dry weight (g) | Shoot dry weight (g) |
|---------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Advenella incenata</i> 22A67 | 13.7 ± 2.50 ^b | 8 ± 0.79 ^b | 5.45 ± 1.88 ^b | 7.90 ± 3.21 ^b |
| <i>Bacillus</i> sp. 13B41 | 13.6 ± 1.71 ^b | 8 ± 0.74 ^b | 5.99 ± 2.10 ^b | 7.61 ± 2.13 ^b |
| <i>Pantoea dispersa</i> 22B45 | 13.6 ± 1.51 ^b | 9 ± 0.52 ^c | 6.34 ± 1.85 ^b | 7.89 ± 2.52 ^b |
| <i>Rhizobium pusense</i> 31B11 | 12.9 ± 2.38 ^b | 8 ± 0.82 ^b | 5.32 ± 1.94 ^b | 6.99 ± 3.11 ^b |
| Un-inoculated | 7.9 ± 1.37 ^a | 6 ± 0.48 ^a | 2.67 ± 0.81 ^a | 2.03 ± 0.76 ^a |

Mean with different letters in the same column show significant difference at $p < 0.05$ (Tukey-Kramer) $n = 10$.

and 99 to 137 %, respectively (Table 3). Silva *et al.* (2016) reported the capacity of *Pantoea* and *Bacillus* to increase shoot and root dry matter by 28 % and 18 %, respectively, in maize plants at 40 days after emergence compared to un-inoculated control. Qureshi *et al.* (2013) showed that the genus *Rhizobium* is an effective plant growth promoter in maize cultivars, due to its ability to improve the photosynthetic rate, up to 21 %. In addition, an increase in plant height and dry matter production was observed, these traits were attributed to the ability of *Rhizobium* strains to produce phytohormones. On the other hand, although there are few reports about maize growth promotion by *Advenella* (Espinoza-Victoria *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2014), this study shows that it can improve maize plant height from the first stages of development (Figure 4), besides increasing the dry matter content of maize.

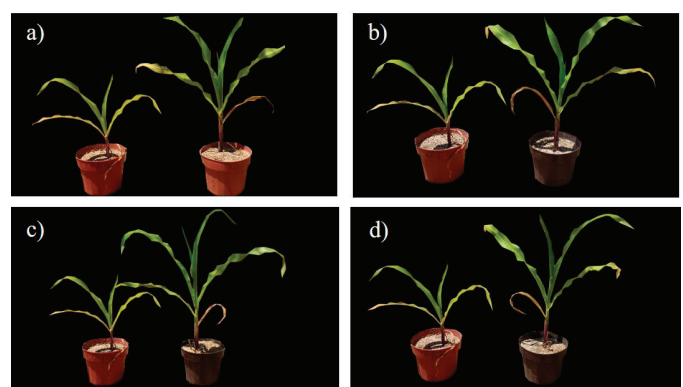


Figure 4. Effect of PGPB inoculation (right) on maize plant growth compared with un-inoculated plants (left). a) *Advenella incenata* 22A67, b) *Bacillus* sp. 13B41, c) *Rhizobium pusense* 31B11, d) *Pantoea dispersa* 22B45.

Figura 4. Efecto de la inoculación de PGPB (derecha) sobre el crecimiento de la planta de maíz en comparación con plantas no inoculadas (izquierda). a) *Advenella incenata* 22A67, b) *Bacillus* sp. 13B41, c) *Rhizobium pusense* 31B11, d) *Pantoea dispersa* 22B45.

CONCLUSION

Plant growth-promoting bacterial strains studied here showed significant plant growth promoting traits in maize plants (root weight, plant height, number of leaves, stem thickness), under greenhouse conditions compared to the un-inoculated plants; however, these beneficial effects were similar among strains. Thus, *Rhizobium pusense* 31B11, *Pantoea dispersa* 22B45, *Bacillus* sp. 13B41, and *Advenella incenata* 22A67, isolated from the Yaqui Valley, are promising bacterial strains to be evaluated in field trials in this area or in others with similar edaphoclimatic conditions, to test their ability to improve grain yield in maize, so that they can be used as native microbial inoculants for sustainable agriculture.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) for financial support through Project 2315932912 "Isolation and characterization of promising microorganisms to improve maize crop in southern Sonora and northern Sinaloa". And to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for providing a fellowship (605488) to Carlos Fernando Amezquita Aviles.

REFERENCES

- Abiala, M. A., Odebode, A. C., Hsu, S.F. and Blackwood, C. B. 2015. Phytobeneficial properties of bacteria isolated from the rhizosphere of maize in southwestern Nigerian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 4736-4743.
- Agbodjato, N. A., Noumavo, P. A., Adjanohoun, A., Agbessi, L. and Baba-Moussa, L. 2016. Synergistic effects of plant growth promoting rhizobacteria and chitosan on in vitro seeds germination, greenhouse growth, and nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology Research International*, 2016:1-11.
- Ahemad, M. and Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26: 1-20.
- Alexander, D. Z. and Zuberer D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12:39-45.
- Cohn, F. 1872. Untersuchungen Über Bakterien. *Beitrage zur Biologie Pflanz*, 1: 1127-1224.
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G. and Sundaram, S. P. 2015. Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95: 38-53.
- Croft, H., Chen, J. M., Luo, X., Bartlett, P., Chen, B. and Staebler, R. M. 2016. Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Global Change Biology*, 23: 3513-3524.
- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A. and Peña-Cabiales, J. J. 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28: 2615-2623.
- de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Herrera-Sepúlveda, A., Valenzuela-Aragón, B. and Estrada-Mora, J. 2018 Collection of edaphic microorganisms and native endophytes to contribute to national food security. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9: 191-202.
- de los Santos-Villalobos, S., Robles, R. I., Parra-Cota, F. I., Larsen, J., Lozano, P. and Tiedje, J. M. 2019. *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69: 3939-3945.
- de Souza, R., Ambrosini, A. and Passaglia, L. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38: 401-419.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D. and Glick, B. R. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106: 85-125.
- Dutta, S. and Podile, A. R. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology*, 36: 232-234.
- Dworking, M. and Foster, J. W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75: 592-602.
- Espinosa-Victoria, D., López-Reyes, L. and La Cruz-Benítez, D. 2009. Uso del gen 16s rRNA para caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas al maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32: 31-37.
- FAO. 2020. FAOSTAT. [Accessed 02 April 2020]. Available in: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Festa, S., Coppotelli, B., Morelli, I. 2016 Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation. *Applied Soil Ecology*, 98: 8-19.
- García-Meléndez, M., Zárate-Camargo, G., Meza-Contreras, J. J., Herrera-Sepúlveda, A., De los Santos-Villalobos, S. and Parra-Cota, F. I. 2017. Abiotic stress tolerance of microorganisms associated with oregano (*Origanum vulgare* L.) in the Yaqui Valley, Sonora. *Open Agriculture*, 2: 260-265.
- Glick, B. R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012:1-15.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 793-796.
- Hussain, M., Mehmood, S., Zahir, Z. A., Naveed, M., Imran, M., Ahmad, I., Ahmed, N. and Nawaz, H. 2016. Modulating nutrition, physiology, and production of maize through *Rhizobium phaseoli* and *Mesorhizobium ciceri* inoculation under drought stress conditions. *7 International Conference on Water Resources and Arid Environments*. pp. 549-559. Riyadh, Saudi Arabia.
- Kaur, G. and Reddy, M. S. 2013. Phosphate solubilizing rhizobacteria from an organic farm and their influence on the growth and yield of maize (*Zea mays* L.). *Journal of General and Applied Microbiology*, 59: 295-303.
- Kennedy, A. C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74: 65-76.
- Kobayashi, T. and Nishizawa, N. K. 2012. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 131-52.
- Kumar, A., Maurya, B. R. and Raghuwanshi, R. 2014. Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3: 121-128.

- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870-1874.
- McCullough, E. B. and Matson, P.A. 2016. Evolution of the knowledge system for agricultural development in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 4609-4614.
- Mehboob, I., Zahir, Z. A., Arshad, M., Tanveer, A. and Khalid, M. 2012. Comparative effectiveness of different *Rhizobium* sp. for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.). *Soil and Environment*, 31: 37-46.
- Meza-Montenegro, M. M., Gandolfi, A. J., Santana-Alcántar, M. E., Klimecki, W. T., Aguilar-Apodaca, M. G., Del Río-Salas, R. and Meza-Figueroa, D. 2012. Metals in residential soils and cumulative risk assessment in Yaqui and Mayo agricultural valleys, northern Mexico. *Science of the Total Environment*, 433: 472-481.
- Montañez, A., Blanco, A. R., Barlocco, C., Beracochea, M. and Sicardi, M. 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58: 21-28.
- Naveed, M., Qureshi, M., Zahir, Z., Hussain, M., Sessitsch, A. and Mitter, B. 2014. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Annals of Microbiology*, 65: 1381-1389.
- Onyia, C. E. and Anyanwu, C. U. 2013. Comparative study on solubilization of tricalcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 4: 52-57.
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M. and Kaushik, S. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 379-391.
- Parra-Cota, F. I., Peña-Cabriales, J. J., de los Santos-Villalobos, S., Martínez-Gallardo, N. A. and Délano-Frier, J. P. 2014. *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. *PloS one*, 9(2).
- Qureshi, M. A., Shahzad, H., Imran, Z., Mushtaq, M., Akhtar, N., Ali, M. A. and Mujeeb, F. 2013. Potential of *Rhizobium* species to enhance growth and fodder yield of maize in the presence and absence of l-tryptophan. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23: 1448-1454.
- Sansinenea, E. 2019. *Bacillus* spp.: As plant growth-promoting bacteria. In: *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*. Singh, H. B., Keswani, C., Reddy, M. S., Royano, E. S., García-Estrada, C.U. (Eds), pp. 225-237. Springer, Singapore.
- Setter, T. L. and Meller, V. H. 1984. Reserve carbohydrate in maize stem: [¹⁴C] glucose and [¹⁴C] sucrose uptake characteristics. *Plant Physiology*, 75: 617-622.
- Seyed Sharifi, R., Khalilzadeh, R. and Soltanmoradi, S. 2017. Evaluation effects of mycorrhizal fungi (AM) and nano zinc oxide on seed yield and dry matter remobilization of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *Journal of Crop Nutrition Science*, 3: 61-69.
- Shahzad, S. M., Khalid, A., Arshad, M., Khalid, M. and Mheboob, I. 2008. Integrated use of plant growth promoting bacteria and P-enriched compost from improving growth, yield and nodulation of chickpea. *Pakistan Journal of Botany*, 40: 1735-1441.
- Sharon, J. A., Hathwaik, L. T., Glenn, G. M., Imam, S. H. and Lee, C. C. 2016. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16: 525-536.
- SIAP-SADER. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). [Accessed March 31 2020]. Available in: http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/
- Silva, K., Perin, L., Gomes, M. D., Baraúna, A. C., Duarte, G. M., Mosqueira, C. A., da Costa, I. B., O'hara, G. and Zilli, J. É. 2016. Diversity and capacity to promote maize growth of bacteria isolated from the Amazon region. *Acta Amazonica*, 46: 111-118.
- Singh, P., Kumar, V. and Agrawal, S. 2014. Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International Journal of Microbiology*, 2014: 1-7.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3: a001438.
- Trabelsi, D. and Mhamdi, R. 2013. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *BioMed Research International*, 2013.
- Valenzuela-Aragon, B., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., Arellano-Wattenbarger, G. L. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. Plant-assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) growth promoting bacteria. *Plant and soil*, 435: 367-384.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I. and de los Santos-Villalobos, S. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36: 95-130.
- Viruel, E., Erazzú, L., Calsina, L., Ferrero, M., Lucca, M. and Siñeriz, F. 2014. Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14: 819-831.
- Wang, J., Li, R., Zhang, H., Wei, G. and Li, Z. 2020. Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. *BMC Microbiology*, 20: 1-12.
- Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. and Lane, D. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.

Elaboración y caracterización físico – mecánica de biocompuestos a base de harina de arroz y fibra de bagazo de caña

Preparation and physical – mechanical characterization of biocomposites based on rice flour and cane bagasse fiber

Yumari Díaz Herrera¹, Carlos Alberto Villaseñor Perea^{1*}, Artemio Pérez López², Arturo Mancera Rico³, María del Rosario Venegas Ordóñez⁴, Araceli Ramírez Jaspeado⁵

¹ Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral de Agua, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México- Texcoco, 56230, Estado de México, México.

² Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México- Texcoco, 56230, Estado de México, México

³ Posgrado en Tecnología de Granos y Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro No. 1923, Buenavista, 25315, Saltillo Coahuila, México.

⁴ Departamento de Ingeniería Mecánica Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México- Texcoco, 56230, Estado de México, México.

⁵ Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Producción de Semillas, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, 56230, Estado de México, México.

RESUMEN

Los materiales biocompuestos fabricados con matrices poliméricas biodegradables y reforzadas con fibras naturales son una propuesta ecológica para diversos sectores de aplicación. El objetivo de esta investigación fue dilucidar las propiedades físicas y mecánicas, así como la degradabilidad en el suelo de materiales elaborados a base de almidón de arroz y fibra de bagazo de caña. Se elaboraron seis biocompuestos de longitudes diferentes, que consideraron la aplicación o no de un tratamiento alcalino, que fueron sometidos a pruebas mecánicas de tracción, flexión y compresión, así como pruebas de absorción de agua y biodegradabilidad en el suelo. Los resultados mostraron que la resistencia mecánica del material fue afectada por el tratamiento alcalino de la fibra y la longitud de esta. La pérdida de peso de los seis biocompuestos, atribuible a su biodegradabilidad en el suelo, fue superior al 70 % después de cuatro semanas. El biocompuesto con longitud de fibra de 0.25 mm y con tratamiento alcalino mostró la mayor resistencia en todas las pruebas mecánicas y representa una propuesta ecológica prometedora para diversas aplicaciones.

Palabras clave: Matriz polimérica biodegradable, tratamiento alcalino, tamaño de fibra, propiedades mecánicas, biodegradabilidad.

ABSTRACT

Biocomposite materials made with biodegradable polymeric matrices and reinforced with natural fibers are an ecological alternative for various application sectors. The objective of this research was to elucidate the physical and mechanical properties, as well as the soil degradability, of materials made from rice starch and cane bagasse fiber. Six biocomposites of different lengths were elaborated, which considered whether or not to apply an alkaline treatment,

and were subjected to mechanical tests of tensile, flexural and compression, as well as tests of water absorption and soil biodegradability. The results showed that the mechanical resistance of the material was affected by the alkaline treatment of the fiber and its length. The weight loss of the six biocomposites, attributable to their soil biodegradability, was greater than 70 % after four weeks. The 0.25mm fiber length biocomposite treated with alkaline, showed the highest strength in all mechanical tests and represents a promising ecological proposal for various applications.

Keywords: Biodegradable polymer matrix, alkaline treatment, fiber size, mechanical properties, biodegradability.

INTRODUCCIÓN

Los materiales de origen sintético derivados del petróleo son ampliamente utilizados por ser económicos, por su fácil manipulación industrial, su resistencia a la corrosión, a la intemperie y a diversos factores biológicos y químicos. Sin embargo, el uso desmedido de dichos materiales en la industria, aunado a que su incorporación al ciclo biológico es muy lenta (100 a 1,000 años aproximadamente), ha despertado serias preocupaciones debido a su acumulación en los vertederos que carecen de regulación sanitaria, en ríos y océanos, amenazando el medio ambiente y sus ecosistemas (Ubaque y Fernando, 2018; Bahl *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2021). De acuerdo con las estimaciones de la ONU (2019), ocho millones de toneladas de plástico terminan en los océanos anualmente afectando a más de 600 especies de fauna marina. Por otra lado, la quema de los materiales plásticos produce gases tóxicos, como los furanos y dioxinas, los cuales son gases de efecto invernadero. Las dioxinas pueden ocasionar problemas a la salud humana y la contaminación del suelo (Wilcox *et al.*, 2015; Bahl *et al.*, 2021).

*Autor para correspondencia: Carlos Alberto Villaseñor Perea
Correo electrónico: carlosvillaseñor660@gmail.com

Recibido: 30 de marzo de 2021

Aceptado: 10 de noviembre de 2021

Con el objetivo de mitigar esta situación se ha propuesto el desarrollo de materiales conocidos como biocompuestos, los cuales presentan ventajas ecológicas al emplear materiales renovables en su elaboración y presentan una biodegradación en el suelo considerablemente más rápida. El uso de fibras naturales utilizadas como refuerzo en la fabricación de compuestos poliméricos utilizados para diversos fines se ha intensificado en los últimos años (Wang *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019). A pesar de que la fabricación de biocompuestos sigue siendo costosa, el uso de fibras naturales en la creación de polímeros biodegradables es una excelente opción para lograr el equilibrio entre el costo y el impacto ambiental (Mazzanti *et al.*, 2019).

Un material alternativo para el refuerzo de biopolímeros es el bagazo de caña, éste es el residuo derivado del proceso agroindustrial en la obtención de azúcar. Al extraer el jugo de los tallos de la caña, la parte sólida llamada bagazo se utiliza tradicionalmente como material combustible en las calderas de los ingenios y como materia prima para la fabricación de papel y paneles aglomerados. Sin embargo, a pesar de sus diversos usos, en países en vías de desarrollo comúnmente son dispersados en vertederos o reducidos a cenizas, provocando problemas de contaminación ambiental (Cabrera *et al.*, 2016).

Becerra *et al.* (2016) mencionan que el bagazo representa el 30 % de la caña molida. En el año 2020, en México, se generaron 16.1 millones de toneladas de bagazo de caña (SIAP, 2020), por lo que se considera un material abundante y disponible en gran parte del país, ya que actualmente operan 50 ingenios distribuidos en 15 estados de la República Mexicana (Tabla 1).

A pesar de que se han realizado investigaciones en donde se ha empleado fibras de yute, sisal, palma datilera, lino, okra y bagazo de caña como refuerzo de biopolímeros, poco se conoce acerca del efecto que produce el tamaño de

Tabla 1. Número de ingenios azucareros por estado en México.

Table 1. Number of sugar mills by state in México.

| Estado | Cantidad de ingenios |
|-----------------|----------------------|
| Campeche | 1 |
| Chiapas | 2 |
| Colima | 1 |
| Jalisco | 6 |
| Michoacán | 3 |
| Morelos | 2 |
| Nayarit | 2 |
| Oaxaca | 3 |
| Puebla | 2 |
| Quintana Roo | 1 |
| San Luis Potosí | 4 |
| Sinaloa | 1 |
| Tabasco | 2 |
| Tamaulipas | 2 |
| Veracruz | 18 |

la fibra en la resistencia mecánica del material (Tamayo *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2018). Por otro lado, los polímeros extraídos de biomasa, especialmente del almidón, han llamado mucho la atención de los investigadores debido a que son un material abundante, de bajo costo, renovable y completamente biodegradable (Wang *et al.*, 2017; Guleria *et al.*, 2018). Tal es el caso del almidón contenido en el grano de arroz quebrado obtenido como subproducto de la molienda, que dependiendo de la calidad del grano y la maquinaria de molienda se puede obtener hasta un 40 % de subproducto (Loubes y Tolaba, 2013). Esto lo convierte en un recurso altamente disponible, además que su producción se extiende a todos los continentes (FAO, 2017).

La creciente preocupación por la conservación de los recursos no renovables y el daño generado al medio ambiente por la utilización desmedida de materiales de origen sintético ha motivado a buscar alternativas ecológicas que emplean en su fabricación los subproductos de la agroindustria. Con estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue dilucidar las propiedades físicas y mecánicas, así como la degradabilidad en el suelo de biocompuestos elaborados a base de almidón de arroz y fibra de bagazo de caña considerando el efecto que produce la longitud y la aplicación del tratamiento alcalino de la fibra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó bagazo de caña donado por el ingenio azucarero de Casasano "La abeja" y arroz quebrado adquirido en el molino de arroz "Buenavista", ambos ubicados en Cuautla, Morelos, México. Se utilizó glicerina con 99.5 % de pureza como plastificante, hidróxido de sodio (NaOH) con peso molecular de 40.00 para el tratamiento alcalino, ácido acético glacial con 99.7 % de pureza para neutralizar la fibra después del tratamiento alcalino y ácido oléico utilizado como desmoldante del biocompuesto (*i.e.*, Reactivos Química Meyer).

Lugar de experimentación

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Materiales Biológicos del Departamento de Ingeniería Mecánica Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México. El bagazo de caña y el arroz quebrado se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta su uso y todas las etapas del experimento se realizaron a temperatura ambiente, 22 ± 2 °C.

Preparación de la fibra

El desmedulado del bagazo de caña se realizó por el método de suspensión (Lois, 1982) utilizando un tamiz de malla de 4 mm, colocando los haces fibrosos en un recipiente para su secado a temperatura ambiente hasta peso constante. Una vez seca, se separó la porción de fibras a las que se les aplicó el tratamiento alcalino, éstas fueron sumergidas en una solución acuosa de NaOH al 5 % a 90 °C por 3 horas (Ibrahim *et al.*, 2014) y enseguida se enjuagaron repetidas veces hasta que las fibras alcanzaron un pH de 7. Previo a los

últimos enjuagues, se sumergieron en ácido acético al 5 % para retirar cualquier residuo de NaOH de la superficie de las fibras, posteriormente la fibra tratada se secó a temperatura ambiente hasta peso constante.

Las fibras con tratamiento alcalino (CTA) y sin tratamiento alcalino (STA) se trituraron con un molino para café KRUPS F203 (KRUPS, Solingen, Alemania) y se colocaron sobre un tamiz vibratorio RETSCH AS 200 (RETSCH, Haan, Alemania) a una frecuencia de 70 Hz durante 10 minutos para obtener las diferentes longitudes de fibra (1.00, 0.50 y 0.25 mm).

Preparación del arroz quebrado

El arroz quebrado se molió en un molino de muestras Tecator Cyclotec 1093 Sample mill (Foss, Hilleroed, Dinamarca) y posteriormente se colocó en un tamiz vibratorio RETSCH AS 200 (RETSCH, Haan, Alemania) a una frecuencia de 70 Hz durante 10 minutos para obtener un tamaño de partícula de 250 μm .

Elaboración del biocompuesto

Se mezclaron agua (50 mL) y glicerina (2 mL) en un agitador magnético con calentamiento CIMAREC+ SP88857100 (Thermo Scientific, Waltham, USA) a 150 °C y 300 rpm, durante 5 minutos aproximadamente hasta observarse evaporación en el líquido. Posteriormente se agregó a la mezcla el polvo de arroz (36 g) y una vez que ésta alcanzó el punto de gel se añadieron 5 g de fibra de bagazo de caña y se mezcló hasta que ambos componentes se integraron completamente. Se colocó la mezcla en moldes de aluminio previamente recubiertos con ácido oleico para facilitar el desmolde, y se introdujo en un horno de aire caliente RIOSSA H-33 (Riossa, Monterrey, México) a 100 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se aplicó sobre los moldes una presión de 30 kPa a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) durante 24 horas para compactar la probeta. Finalmente se colocaron los moldes en el horno a una temperatura de 100 °C durante 40 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. Se realizó el mismo procedimiento para los seis tratamientos.

Pruebas mecánicas del biocompuesto

Resistencia a la Tracción. Se realizaron pruebas de tracción de acuerdo con la norma ASTM D3039 en una máquina universal de ensayos mecánicos INSTRON modelo 3382 (INSTRON, Norwood, USA) a una velocidad de cruceta de 4 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$, con probetas de dimensiones de 250 x 25 x 4 mm (largo x ancho x espesor). Las probetas se sujetaron entre las mordazas de la máquina cubriendo una longitud de 75 mm en cada extremo de la probeta, la tracción se aplicó hasta la ruptura.

Resistencia a la flexión. Se determinó la resistencia a la flexión a tres puntos de acuerdo con la norma ASTM D7264, para lo cual se utilizaron probetas de dimensiones de 100 x 13 x 4 mm y una distancia entre soportes de 75 mm; se utilizó una máquina universal de ensayos mecánicos INSTRON modelo 3382 (INSTRON, Norwood, USA), la velocidad de desplazamiento de la cruceta se fijó en 5 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$.

Resistencia a la compresión. La resistencia a compresión se determinó de acuerdo con la norma ASTM D3410, para lo cual se utilizaron probetas de 25 x 25 x 4 mm. La probeta se colocó entre los platos de compresión de la máquina universal INSTRON modelo 3382 (INSTRON, Norwood, USA) aplicando una carga compresiva hasta la ruptura sobre un tramo de 25 mm a una velocidad de 3 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$.

Contenido de humedad

La humedad se determinó en probetas de dimensiones de 100 x 13 x 4 mm, las cuales se secaron a 105 °C hasta peso constante, se registró el peso antes (M1) y después (M2) del secado para calcular el contenido de humedad con la Ecuación 1 (Jumaidin *et al.*, 2017).

Absorción de agua

La absorción de agua del biocompuesto se determinó siguiendo la metodología reportada por (Guleria *et al.*, 2018). Las probetas, previamente secadas a 90 °C en un tiempo aproximado de 24 horas hasta alcanzar peso constante (P1), se sumergieron en 60 mL de agua a temperatura del ambiente en intervalos de tiempo de 1 hora. Al retirarlas del agua se limpiaron con un paño de algodón y se registró nuevamente el peso (P2). El porcentaje de absorción de agua, durante 20 horas continuas, se calculó con la Ecuación 2.

Biodegradabilidad

El porcentaje de biodegradabilidad del biocompuesto se determinó a partir del método de enterramiento en el suelo (Franco *et al.*, 2004). Se enterraron probetas de 100 x 13 x 4 mm en un suelo con un pH de 6 y 40 % de materia orgánica (base peso seco) a una profundidad de 8 cm. La temperatura se mantuvo a 22 ± 2 °C y el contenido de humedad en el suelo se mantuvo en un rango de 30 a 40 % al agregar 500 mL de agua por cada 1500 g de suelo cada 3 días (Wang *et al.*, 2017; Guleria *et al.*, 2018). Antes de enterrar las probetas se secaron en un horno RIOSSA H-33 (Riossa, Monterrey, México) a 90 °C hasta peso constante y se anotaron los pesos iniciales (Pi), después de intervalos de tiempo de 1 semana las probetas se limpiaron con agua y posteriormente se secaron a 90 °C hasta peso constante, finalmente se registró el peso final (Pf) para poder obtener el porcentaje de biodegradabilidad (Ecuación 3).

Análisis de microestructura

Las superficies de fractura por tensión de los biocompuestos se observaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6390 (JEOL, Tokio, Japón) a una aceleración de voltaje de 10 kV. Todas las muestras se cubrieron con oropaladio en proporción 80-20 respectivamente, para inducir la conductividad.

Diseño del experimento

Se utilizó un diseño experimental con asignación de tratamientos al azar con dos factores de estudio, tratamiento alcalino con dos niveles (CTA y STA) y longitud de fibra de bagazo de caña con tres niveles (1.00, 0.50 y 0.25 mm).

Cada tratamiento fue evaluado en cinco probetas para cada prueba mecánica y en cinco probetas para las pruebas de contenido de humedad y absorción de agua.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se condujo de acuerdo con el diseño experimental. Se realizó un análisis de la varianza simple y multifactorial para identificar el efecto de los factores sobre las propiedades mecánicas. Se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey, 0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento mecánico del material

La resistencia mecánica a la tracción del biocompuesto con tratamiento alcalino y longitud de fibra de 0.25 mm resultó estar ligeramente por debajo de algunos plásticos (Tabla 2), tales como el polietileno de baja densidad (5 a 13 MPa), polietileno lineal de baja densidad (13 a 27 MPa), compuesto flexible de policloruro de vinilo (8 a 24 MPa) y considerablemente superior a los plásticos expansibles tales como poliestireno expansible (0.134 MPa), polipropileno expansible (0.363 MPa) y polietileno expansible (0.275 MPa) (IMPI, 2000), de tal manera que dicho biocompuesto es una propuesta ecológica prometedora para diversas aplicaciones.

De forma general, se observa que, al evaluar la interacción entre los factores de tratamiento alcalino de la fibra y longitud de ésta, hay una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) sobre la resistencia mecánica del material (Tabla 3). Los compuestos con longitud de fibra corta y con la aplicación de tratamiento alcalino mostraron una mayor resistencia mecánica, lo que se atribuye a una mejor transferencia de esfuerzos de la matriz hacia la fibra.

Propiedades de tracción. Se observó que la resistencia a la tracción y el módulo de Young aumentan en los biocompuestos que tienen fibra con tratamiento alcalino (CTA, Tabla 3), esto es debido a que, al remover parte de la lignina de las fibras, se modifica químicamente su superficie y aumenta la irregularidad de la misma, ocasionando una mejora en el enlace interfacial fibra-matriz (Saba *et al.*, 2015). De igual forma,

Wang *et al.* (2017) sugieren que una buena adhesión fibra-matriz resultará en un incremento en el esfuerzo de tracción, debido a la similitud química en la estructura de ambos polisacáridos (celulosa y almidón), ya que dichos polímeros interactúan a través de puentes de hidrógeno formando una red rígida que incrementa el esfuerzo de tensión.

Por otro lado, hay una tendencia en el incremento de la resistencia a la tracción en compuestos con menor tamaño de partícula (Tabla 2). La mejora en el esfuerzo de tracción en compuestos con tratamiento alcalino de la fibra y con menor longitud de ésta, concuerda con lo reportado en la literatura (Wang *et al.*, 2017; Guleria *et al.*, 2018) y se atribuye a una mejor transferencia de esfuerzos de la matriz hacia la fibra.

Propiedades de compresión. Los compuestos reforzados con fibra CTA, mostraron una mayor resistencia a la compresión que aquellos STA, siguiendo la misma dirección que en la prueba a la tracción, por lo que el comportamiento

Tabla 3. Efectos principales del tratamiento y la longitud de la fibra sobre la resistencia a la compresión (RC), resistencia a la tracción (RT), resistencia a la flexión (RF) y módulo de Young (MY) de seis tipos de compuestos elaborados con harina de arroz y fibra de bagazo de caña.

Table 3. Main effects of treatment and fiber length on compressive strength (RC), tensile strength (RT), flexural strength (RF) and Young's modulus (MY) of six biocomposites made with rice flour and cane bagasse fiber.

| Factor | RC (MPa) | RT (MPa) | RF (MPa) | MY (MPa) |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| <i>Tratamiento (T)</i> | | | | |
| STA | 3.74 b | 2.40 b | 7.28 a | 48.14 b |
| CTA | 8.65 a | 3.22 a | 6.75 a | 114.96 a |
| <i>Longitud de fibra (LF), mm</i> | | | | |
| 1.00 | 5.32 b | 2.18 b | 5.77 c | 62.97 b |
| 0.50 | 5.20 b | 3.15 a | 7.17 b | 65.83 b |
| 0.25 | 8.06 a | 3.09 a | 8.10 a | 115.91 a |
| <i>Interacción T * LF</i> | | | | |
| | $P \leq 0.05$ | $P \leq 0.01$ | $P \leq 0.01$ | $P \leq 0.1$ |

Niveles factor: STA = sin tratamiento alcalino, CTA = con tratamiento alcalino. Misma letra dentro de cada columna y factor, no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

Tabla 2. Comparación de medias de resistencia a la compresión (RC), resistencia a la tracción (RT), resistencia a la flexión (RF), módulo de Young (MY) y contenido de humedad (CH) de seis tipos de biocompuestos elaborados con harina de arroz y fibra de bagazo de caña (media \pm desv. est., n=5).

Table 2. Means comparison of compressive strength (RC), tensile strength (RT), flexural strength (RF), Young's modulus (MY), and moisture content (CH) of six biocomposites made with rice flour and cane bagasse fiber (mean \pm std. dev., n=5).

| Tratamiento | Longitud de fibra (mm) | RC, MPa | RT, MPa | RF, MPa | MY, MPa | CH, % |
|-------------|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| STA | 1.00 | 2.63 \pm 0.21 d | 2.06 \pm 0.13 c | 6.88 \pm 0.63 b | 33.98 \pm 6.86 c | 7.80 \pm 1.09 a |
| | 0.5 | 3.41 \pm 0.16 d | 2.84 \pm 0.16 b | 7.44 \pm 0.78 ba | 44.59 \pm 8.49 c | 7.68 \pm 0.94 a |
| | 0.25 | 5.18 \pm 0.39 c | 2.31 \pm 0.13 c | 7.52 \pm 0.78 ba | 65.85 \pm 4.78 cb | 7.32 \pm 0.00 a |
| CTA | 1.00 | 8.02 \pm 0.64 b | 2.31 \pm 0.20 c | 4.66 \pm 0.62 c | 91.83 \pm 13.21 b | 7.73 \pm 0.09 a |
| | 0.5 | 7.00 \pm 0.70 b | 3.46 \pm 0.35 a | 6.90 \pm 1.17 b | 87.07 \pm 27.10 b | 8.09 \pm 1.22 a |
| | 0.25 | 10.94 \pm 1.37 a | 3.88 \pm 0.32 a | 8.68 \pm 0.48 a | 165.96 \pm 32.07 a | 7.71 \pm 1.93 a |

STA = sin tratamiento alcalino, CTA = con tratamiento alcalino, n = tamaño de muestra. Medias con la misma letra dentro de cada columna, no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

obtenido puede explicarse de manera similar. De igual manera, se observa que existen diferencias significativas entre los biocompuestos con diferente longitud de fibra, donde la longitud de fibra de 0.25 mm ocasionó una mayor resistencia a compresión que las longitudes de 0.50 y 1.00 mm (Tabla 3). La menor resistencia a la compresión en biocompuestos reforzados con fibra de mayor longitud se atribuye a que un mayor tamaño de partícula resulta en un mayor espacio entre partículas, por lo tanto, mayor porosidad del material (Tumwesigye *et al.*, 2020). Diversas investigaciones han reportado que el incremento en la porosidad disminuyó la resistencia mecánica en los biocompuestos reforzados con fibras naturales de okra, algodón, lino y palma datilera (Prachayawarakorn *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2014; Guleria *et al.*, 2018).

Propiedades de flexión. Los resultados del ensayo de flexión muestran diferencias significativas entre los tres tamaños de longitud de fibra; para este caso, la resistencia mecánica del biocompuesto está fuertemente determinada por la longitud de la fibra, siendo más resistente con fibra de longitud más corta (0.25 mm) (Tabla 3).

Contrario a los resultados obtenidos en la prueba de tracción y compresión, en la prueba de flexión no se encontraron diferencias significativas en la aplicación del tratamiento alcalino de las fibras. Esto se atribuye principalmente a que la distancia con el eje neutro es muy corta, por la posición en que fueron ensayadas las probetas, de manera que los esfuerzos de tracción y compresión en los extremos superior e inferior se multiplicaron por valores muy bajos; en ensayos de probetas de mayor grosor, se esperaría que la resistencia a flexión sea proporcional a la resistencia a tracción y a compresión.

Sin embargo, a pesar de no existir diferencias significativas en la aplicación del tratamiento alcalino, el compuesto con tratamiento alcalino y menor longitud de fibra resultó ser el más resistente de todos (Tabla 2), lo que concuerda con los resultados de compresión y tracción. La resistencia a la flexión fue superior a la de tracción, lo que concuerda con lo obtenido por otros autores como Morgan (2005) y Guleria *et al.* (2018).

Contenido de humedad

A pesar de que se observan ligeras variaciones entre tratamientos en el contenido de humedad de los biocompuestos, no hubo diferencias significativas entre ninguno de ellos (Tabla 2); ni el tratamiento alcalino ni la longitud de fibra ocasionaron diferencia en el contenido de humedad.

Absorción de agua

Se observó que el compuesto sin tratamiento alcalino y con longitud de fibra de 0.25 mm absorbió menos agua, mientras que el compuesto sin tratamiento alcalino y con longitud de fibra de 1.00 mm absorbió más agua (Figura 1), lo que sugiere que en compuestos con fibra STA, mientras más corta sea la longitud de ésta, menos agua absorbe. Los compuestos con fibra CTA manifestaron una absorción de agua más lenta; los materiales elaborados con fibra STA absorbieron más del 60 % de agua en las primeras horas, mientras que los compuestos con fibra CTA se mantuvieron por debajo de esta cifra. La absorción de agua es indeseable en la mayoría de las aplicaciones potenciales del biocompuesto.

Biodegradabilidad

Luego de 4 semanas, la biodegradabilidad fue de 73.3, 76.7 y 74.7 % para los biocompuestos CTA, y de 80.9, 81.7 y

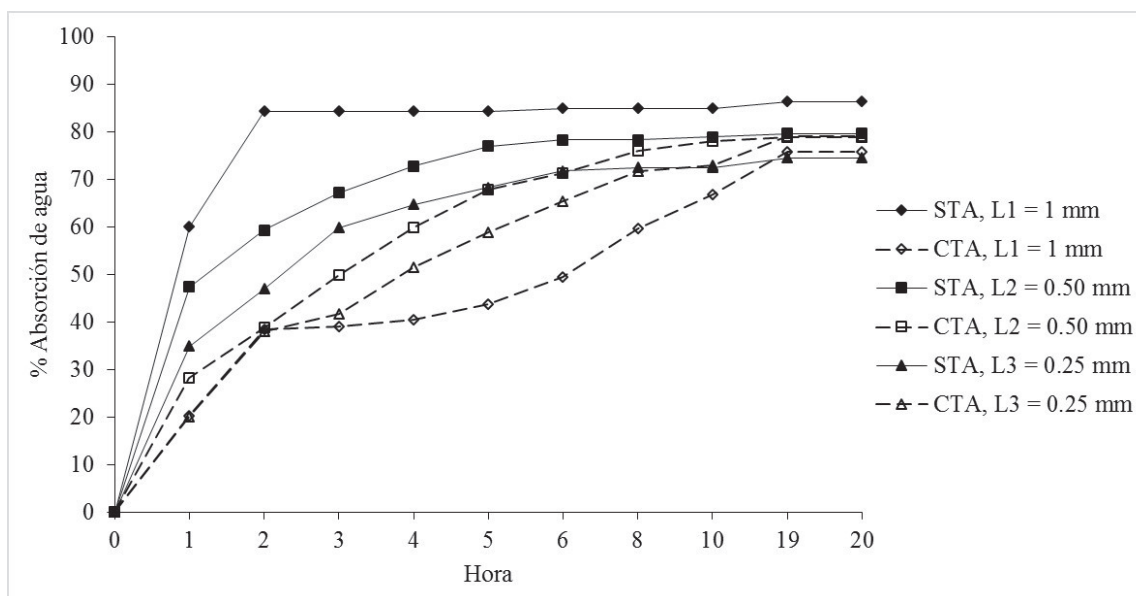


Figura 1. Absorción de agua de compuestos con fibra sin tratamiento alcalino (STA) y con tratamiento alcalino (CTA), con tres longitudes de fibra (L1, L2 y L3).

Figure 1. Water absorption of fiber composites without alkaline treatment (STA) and with alkaline treatment (CTA), with three fiber lengths (L1, L2 and L3).

81.7 % para los biocompuestos STA con longitud de fibra de 0.25, 0.50 y 1.00 mm, respectivamente (Figura 2). Es claro que los compuestos CTA presentan un porcentaje de biodegradabilidad menor a los compuestos STA (Figura 2), este fenómeno puede ser atribuido a que el tratamiento alcalino mejora el enlazamiento interfacial fibra-matriz, produciendo una red fuerte que reduce el acceso de agua y microflora del suelo, resultando en una mayor resistencia a la degradación (Franco *et al.*, 2004; Guleria *et al.*, 2018). Los compuestos elaborados con fibra de longitud corta (0.25 mm) tanto en los compuestos CTA y STA, presentaron un menor porcentaje de biodegradabilidad.

La tasa de degradación de los seis biocompuestos fue mayor en la primera semana (Figura 2), lo que se atribuye a que al degradarse primero el almidón se pierde la integridad estructural del biocompuesto (Ibrahim *et al.*, 2014), formando agujeros o canales que favorecen la entrada de microorganismos presentes en el suelo, ocasionando que la tasa de degradación aumente rápidamente en los primeros días (Franco *et al.*, 2004).

Análisis de microestructura

En las micrografías (Figura 3), se observa la morfología de la superficie de fractura de los compuestos sin tratamiento alcalino y 1.00 mm de longitud de fibra (Figura 3a), sin tratamiento alcalino y 0.25 mm de longitud de fibra (Figura 3b) y con tratamiento alcalino y 0.25 mm de longitud de fibra (Figura 3c), en los cuales se presentan diferentes mecanismos de falla: de la matriz, de la interfaz fibra matriz y de las fibras (Ibrahim *et al.*, 2014).

En todos los biocompuestos se observa la falla de la matriz; sin embargo, en la Figura 3 (a y b) se observan fallas en la interfaz fibra-matriz, o separación de la fibra y la matriz, debido a una pobre adherencia entre ambas; por otro lado, en la Figura 3c se observa que la fractura se presentó sin mostrarse una separación entre la fibra y la matriz, reflejando una buena adhesión entre ambas y mayor resistencia a compresión, tracción y Módulo de Young (Tabla 3), lo que se atribuye al tratamiento alcalino, lo cual concuerda con resultados obtenidos en otras investigaciones (Ibrahim *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2018).

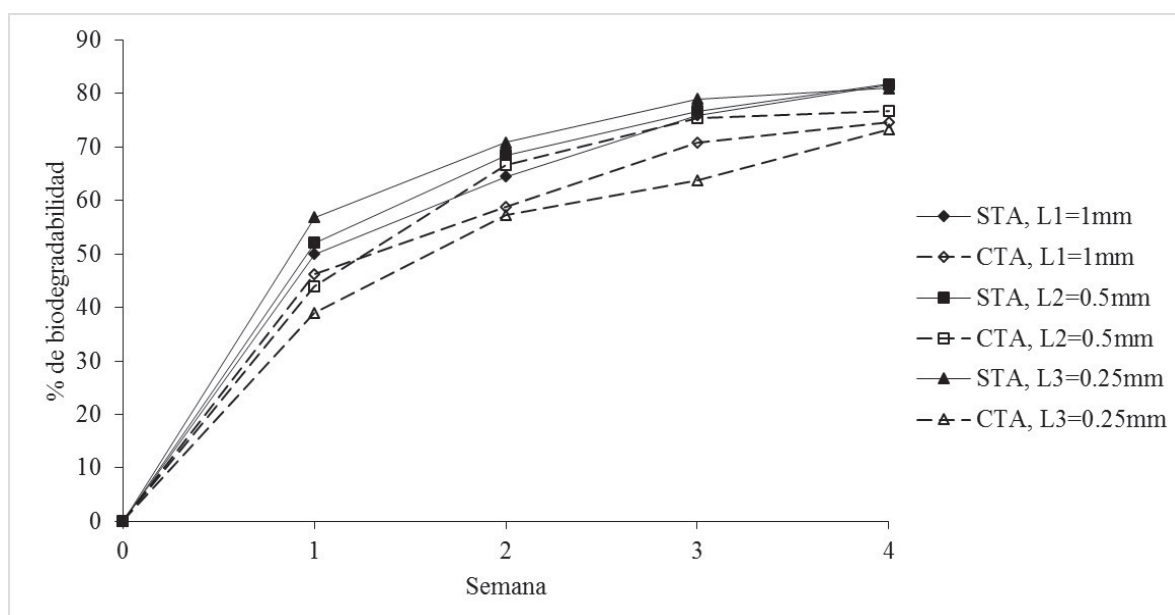


Figura 2. Biodegradabilidad en suelo de compuestos con fibra sin tratamiento alcalino (STA) y con tratamiento alcalino (CTA), con tres longitudes de fibra (L1, L2 y L3).

Figure 2. Biodegradability in soil of fiber composites without alkaline treatment (STA) and with alkaline treatment (CTA), with three fiber lengths (L1, L2 and L3).

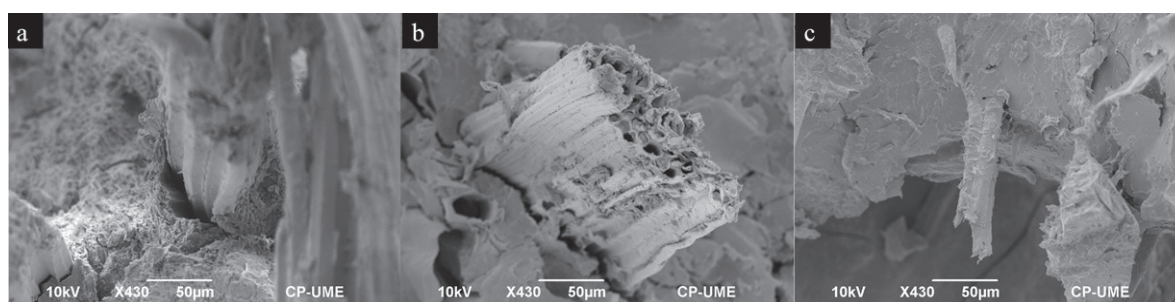


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido: a) biocompuesto sin tratamiento alcalino y longitud de fibra de 1 mm; b) biocompuesto sin tratamiento alcalino y longitud de fibra de 0.25 mm; c) biocompuesto con tratamiento alcalino y longitud de fibra de 0.25 mm.

Figure 3. SEM micrographs: a) biocomposite without alkaline treatment and 1 mm fiber length; b) biocomposite without alkaline treatment and 0.25 mm fiber length; c) biocomposite with alkaline treatment and 0.25 mm fiber length.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de las pruebas mecánicas indican que hay una mejor transferencia de esfuerzos entre fibra – matriz en aquellos compuestos elaborados con fibra con tratamiento alcalino y menor longitud. Las propiedades mecánicas de los biocompuestos elaborados con fibra con tratamiento alcalino resultaron ser más resistentes que aquellos elaborados con fibra sin tratamiento alcalino. Las pruebas mecánicas muestran que el tamaño de longitud de la fibra es un factor que influye significativamente en la resistencia mecánica del material, el cual fue más resistente con una longitud menor. El biocompuesto con tratamiento alcalino y longitud de fibra de 0.25 mm resultó ser el más resistente de todos los tratamientos y presentó propiedades mecánicas superiores a las de los plásticos expansibles con un porcentaje de peso perdido de 73.33 % después de cuatro semanas, por lo que el material elaborado es una propuesta ecológica para diversos sectores.

REFERENCIAS

- Bahl, S., Dolma, J., Singh, J.J. y Sehgal, S. 2021. Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*. 39: 31-34.
- Becerra, A.P., Buitrago, A.L. y Pinto, P. 2016. Sostenibilidad del aprovechamiento del bagazo de caña de azúcar en el Valle del Cauca, Colombia. *Ing. Solidaria*. 12(20): 133-149.
- Cabrera, E., León V., De la Caridad Montano A. y Dopico D. 2016. Caracterización de residuos agroindustriales con vistas a su aprovechamiento. *Centro azúcar*. 43: 27-35.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Bases de datos estadísticos. FAOSTAT. [Consultado octubre 2019] 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Accessed October 2019).
- Franco, C.R., Cyras, V.P., Busalmen, J.P., Ruseckaite, R.A. y Vázquez, A. 2004. Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *Polymer degradation and stability*. 86: 95-103.
- Guleria, A., Singh, A. y Rana, R.K. 2018. Mechanical, thermal, morphological, and biodegradable studies of okra cellulosic fiber reinforced starch-based biocomposites. *Advances in polymer technology*. 37(1): 1-9.
- Ibrahim, H., Farag, M., Megahed, H. y Mehanny, S. 2014. Characteristics of starch-based biodegradable composites reinforced with date palm and flax fibers. *Carbohydrate polymers*. 101: 11-19.
- IMPI (Instituto Mexicano del Plástico Industrial). 2000. *Enciclopedia del plástico*, Tomo I. México: Autor.
- Jumaidin, R., Sapuan, S.M., Jawaid, M., Ishak, M.R. y Sahari, J. 2017. Thermal, mechanical, and physical properties of seaweed/sugar palm fibre reinforced thermoplastic sugar palm Starch/Agar hybrid composites. *Inter. Journal of biological macromolecules*. 97: 606-615.
- Lois, J. 1982. *Sistemas y equipos de desmedulado en la industria del bagazo de la caña de azúcar*. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba.
- Loubes, M.A. y Tolaba, M. 2013. Arroz: rendimiento de molienda mediante análisis de imágenes. *La alimentación latinoamericana*. 308: 44-49.
- Mazzanti, V., Pariante, R., Bonanno, A., Ruiz de Ballesteros, O., Mollica, F. y Filippone, G. 2019. Reinforcing mechanisms of natural fibers in green composites: Role of fibers morphology in a PLA/hemp model system. *Composites science and technology*. 180: 51-59.
- Morgan, P. 2005. *Carbon fibers and their composites*. Taylor and Francis Group. Florida, USA.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). Noticias ONU. Compromiso mundial para reducir los plásticos de un solo uso. [Consultado 19 agosto de 2021] 2019. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2019/03/1452961>
- Prachayawarakorn, J., Sangnitdej, P. y Boonpasith, P. 2010. Properties of thermoplastic rice starch composites reinforced by cotton fiber or low-density polyethylene. *Carbohydrate polymers*. 81: 425-433.
- Qin, M., Chen, C., Song, B., Shen, M., Cao, W., Yang, H., Zeng, G. y Gong, J. 2021. A review of biodegradable plastics to biodegradable microplastics: Another ecological threat to soil environments? *Journal of Cleaner Production*. 312 art. 127816.
- Saba, N., Pariadah, M.T. y Jawaid, M. 2015. Mechanical properties of kenaf fibre reinforced polymer composite: A review. *Construction and building materials*. 76: 87-96.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Producción nacional de caña de azúcar. [Consultado 16 agosto 2021] 2020. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Silva, C. G., Campini, P.A.L., Rocha, D.B. y Rosa, D.S. 2019. The influence of treated eucalyptus microfibers on the properties of PLA biocomposites. *Composites science and technology*. 179: 54-62.
- Tamayo, E., Sarasty, O. y Mosquera, E. 2017. Aprovechamiento de residuos ligno-celulósicos en la elaboración de empaques secundarios ecológicos. *Rev. Ind. Data* 20(2): 37-42.
- Tumwesigye, K.S., O'Brien, E., Oliveira, J.C., Crean, A. y Sousa-Gallagher, M.J. 2020. Engineered food supplement excipients from bitter cassava for minimisation of cassava processing waste in environment. *Future Foods*. 1-2 art. 100003.
- Ubaque, C.A. y Fernando, I. 2018. Elaboración de bioempaques a partir de almidones nativos y aceites esenciales prolongando vida útil en fresas. *Rev. Colombiana de investigaciones agroindustriales* 5(1): 71-86.
- Wang, P., Chen, F., Zhang, H., Meng, W., Sun, Y. y Liu, C. 2017. Large-scale preparation of jute-fiber-reinforced starch-based composites with high mechanical strength and optimized biodegradability. *Starch/Stärke*. 69: 1-11.
- Wilcox, C., Van Sebille, E. y Hardesty, B.D. 2015. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 112(38): 11899-11904.
- Xie, Q., Li, F., Li, J., Wang, L., Li, Y., Zhang, C., Xu, J. y Chen, S. 2018. A new biodegradable sisal fiber–starch packing composite with nest structure. *Carbohydrate polymers*. 189: 56-64.

Consortios de hongos micorrízicos y rizobacterias en el control biológico de *Phytophthora capsici* en cultivares de *Capsicum annuum*

Consortia of mycorrhizal fungi and rhizobacteria in the biological control of *Phytophthora capsici* in *Capsicum annuum* cultivars

Lucio Leos-Escobedo¹, Mario García-Carrillo¹, Julian Delgadillo-Martínez², Ana Alejandra Valenzuela García³, Azareel Angulo-Castro⁴, Pablo Preciado-Rangel⁵, Edgar Omar Rueda Puente^{6*}

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Regional Laguna. Periférico y carretera a Santa Fe, CP. 27000. Torreón, Coahuila, México.

² Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Carretera México-Texcoco, Km 35.5, CP. 56230. Montecillo, Texcoco, estado de México.

³ Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Agricultura y Zootecnia. Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo km.32. C.P. 34000. Gómez Palacio, Durango, México.

⁴ Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa. Carretera Culiacán-el Dorado Km 17.5. CP. 80000. Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

⁵ Tecnológico Nacional de México, Campus Instituto Tecnológico de Torreón (TecNm-ITT), Antigua Carretera Torreón-San Pedro km 7.5, C.P. 27170. Torreón, Coahuila, México.

⁶ Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, Colonia Centro, C.P. 83000. Hermosillo, Sonora México.

RESUMEN

La reconversión de la agricultura, demanda alternativas sustentables entre los que destacan el uso de hongos rizosféricos =hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rpcv). El objetivo general de la presente investigación consistió en evaluar consorcios de hongos micorrízicos y rizobacterias como control biológico vs *Phytophthora capsici*, en cultivares de chile (*Capsicum annuum* L.). Se evaluaron 23 genotipos de chiles. Los HMA que conformaron el consorcio fueron: seis cepas de *Rhizophagus intraradices*. Asimismo, se incluyeron cuatro Rpcv, dos del género *Pseudomonas*, *Acinetobacter guillouiae* y *Aeromona caviae*. Los tratamientos de estudio fueron cuatro: T1= Testigo (Sin aporte nutrimental (agua)), T2= Consorcio = (mezcla) de los seis HMA, T3= Consorcio de seis HMA más el consorcio de cuatro Rpcv, T4= Fertilización química a base una solución nutrimental. Se incrementó la resistencia de plantas al ataque de *P. capsici*, resultando en una reducción en su capacidad de ataque, en plantas de 23 cultivares de chile. Los cultivares de chiles tipo Pasilla y tipo Guajillo, presentaron la mayor resistencia al ataque de *P. capsici*, cuando fueron inoculados con HMA+Rpcv, mientras que los chiles tipo Serrano, Puya y Jalapeño, fueron los de mayor susceptibilidad al ataque del hongo fitopatógeno.

Palabras clave: Micorrizas, secadera del chile, fitopatógenos, control biológico.

ABSTRACT

The reconversion of agriculture demands sustainable alternatives, among which the use of rhizospheric fungi = arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting rhizobacteria (Rpcv) stand out. The general objective

of the present investigation was to evaluate consortiums of mycorrhizal fungi and rhizobacteria as biological control vs *Phytophthora capsici*, in cultivars of 23 genotypes of chili peppers. The AMF that made up the consortium were: six strains of *Rhizophagus intraradices*. Likewise, four strains of Rpcv, three of the *Pseudomonas* genus, *Acinetobacter guillouiae* and *Aeromona caviae*. The study treatments were four: T1 = Control (No nutritional contribution (water)), T2 = Consortium = (mixture) of the six AMF, T3 = Consortium of six AMF plus the consortium of four Rpcv, T4 = Chemical fertilization based on a nutrient solution. The plants resistance to the *P. capsici* attack increased, resulting in a reduction in the fungus attack capacity in plants of 23 cultivars of chile. The Pasilla-type and Guajillo-type chili cultivars presented the highest resistance to the attack of *P. capsici*, when inoculated with AMF + Rpcv, while the Serrano, Puya and Jalapeño-type chilies were the ones with the highest susceptibility to the attack of the phytopathogenic fungus.

Key words: Mycorrhizae, chilli drier, phytopathogens, biological control.

INTRODUCCIÓN

Un factor primordial en la pérdida de cultivos de interés agrícola es por problemas fitosanitarios, principalmente por aquellas ocasionadas por fitopatógenos durante el desarrollo de la planta (Ritz *et al.*, 2015). Entre los agentes causales, destacan los hongos y bacterias, los cuales, generan pérdidas de hasta un 80% en un sistema de producción agrícola, cuando éstas no son tratadas con eficacia y en condiciones favorables para los patógenos. En la República Mexicana, el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es de una

*Autor para correspondencia: Edgar Omar Rueda Puente
 Correo electrónico: erueda04@santana.uson.mx

Recibido: 22 de abril de 2021

Aceptado: 24 de noviembre de 2021

gran importancia por el aspecto económico que genera, el social y el alimenticio; sin embargo, un problema fitosanitario que afecta a su producción, es la enfermedad denominada marchitez del chile, que puede generar pérdidas económicas hasta en un 76% en estado de germinación y plántula, y hasta en un 93% cuando la planta es afectada en la fase de floración (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017), considerando condiciones del ambiente favorable para el patógeno, como las de alta humedad ambiental y también a nivel de suelo, además de una falta de prácticas de manejo inadecuadas (Guigón-López y González-González, 2001). La presencia de fitopatógenos, puede ocurrir en los diferentes agrosistemas de producción como son a campo abierto, invernadero y casa sombra (Guigón-López y González-González, 2001). Entre los diversos factores bióticos que están implícitos en la marchitez del chile se encuentra un complejo de hongos del género *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp., *Vesicatoria* spp., *Alternaria alternata*, *Oidiopsis taurica*, *Leveillula taurica*, *Sclerotinia sclerotium* y *Sclerotium rolfsii* (Chew *et al.*, 2008), ocasionando grandes pérdidas en la producción no solo en México, sino a nivel mundial (Vásquez *et al.*, 2009; Montero-Tavera *et al.*, 2013). Otro hongo que sobresale además de los previamente citados, es *Phytophthora capsici* (Segovia *et al.*, 1994; Guigón-López *et al.*, 2003), el cual, es un Oomicete que ocasiona daños significativos y pérdidas desde un 10 hasta un 100% (Avelar, 1989) al presentarse por todos los continentes con afectaciones considerables (Goldberg, 1998).

Para controlar este problema fitosanitario, los agricultores se han basado en el uso de fungicidas químicos afectando al medio ambiente, a la salud humana, una resistencia a los fungicidas y el incremento en los costos de producción (Chew *et al.*, 2008; Hernández-Castillo *et al.*, 2014). Uno de los controles solicitados en la actual Agricultura de Conversión, demanda aquellos que sean sustentables al medio ambiente, entre ellos figuran la combinación de biofumigaciones (Wang *et al.*, 2014) y el uso de injertos en patrones resistentes (Gibaldi *et al.*, 2013); actualmente desde hace una década resalta el uso de hongos rizosféricos =hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rpcv), los primeros con acción antagónica vs especies del género *Fusarium* y de *Rhizoctonia solani* (Ozgonen y Erilic, 2007; Ramos-Sandoval *et al.*, 2010; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017); y los segundos han sido evaluados vs *Pseudomonas corrugata* y *Chryseobacterium indologenes*, entre otros más (Kyung and Deok, 2012). Ambos microorganismos (HMA y Rpcv), tienen la capacidad de encontrarse en el interior de tejidos sanos (Schulz y Boyle, 2006; Pérez y Chamorro, 2013), y cumplir varias funciones como la promoción del crecimiento vegetal, control biológico de fitopatógenos, mejorando la eficiencia en procesos de fitorremediación de compuestos tóxicos y como fuente inagotable de más de 20,000 compuestos biológicamente activos que influyen en el rendimiento y la supervivencia de la planta (Pérez y Chamorro, 2013), además producen un gran número de metabolitos secundarios que funcionan como antibióticos (Castillo *et al.*, 2002; Igarashi *et al.*, 2007). En los últimos años, el control biológico mediante

organismos antagónicos (HMA y Rpcv), se advierte como una valiosa herramienta para la protección de los cultivos hortícolas contra hongos fitopatógenos sobre todo cuando éstos son aplicados mediante consorcios (mezclas) o co-inoculaciones, ya que se han obtenido resultados significativos en diversas variables morfofisiológicas; los consorcios microbianos son asociaciones naturales de dos o más especies que actúan como una comunidad. Es decir, se trata de sistemas naturales en los que microorganismos de distintas especies, a menudo de distintos géneros, coexisten espacialmente y cooperan, posibilitando así la supervivencia de todos ellos y con quien cohabitan, asimismo, estas poblaciones mixtas tienen la capacidad y los recursos necesarios para llevar a cabo funciones que resultan muy complicadas o incluso imposibles de realizar para una única especie (Ramírez-Mares y Hernández, 2015).

El estado de México, sobresale a nivel nacional como un fuerte productor de chile. Sin embargo, los productores agrícolas son afectados por la presencia del hongo *Phytophthora capsici* como agente causal de la marchitez del tomate; actualmente están interesados en el uso de este tipo de alternativas biológicas como son los consorcios microbianos para el control del hongo, y es por lo anterior que el objetivo de la presente investigación consistió en evaluar consorcios de hongos micorrízicos y rizobacterias como control biológico vs *Phytophthora capsici*, en cultivares de chile (*Capsicum annuum* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 23 genotipos de chile procedentes de diversas localidades agrícolas en el país (Tabla 1), divididos en cinco tipos: Pasillas (3), Anchos (4), Guajillos (4), Puya (4), Serrano (3) y Jalapeño (5) (Tabla 1), en condiciones de invernadero en el Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, en Montecillo, Texcoco, México. El trabajo se realizó en un invernadero de vidrio durante el período otoño-invierno-primavera 2019-2020.

Desinfestación de la semilla y preparación de semilleros para la siembra

Las semillas utilizadas para la siembra de cada uno de los 23 genotipos de chile se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante siete minutos, después se realizaron tres enjuagues con agua destilada y finalmente colocadas al sol para eliminar los excesos de agua. A la par, semilleros de unicel de 200 cavidades se les agregó sustrato de turba (Peat moss) más Agrolita en una proporción 50:50 (V/V). La esterilización del sustrato se realizó en olla de presión a 18.5 lb pulg⁻² (psi), con una temperatura de 120 °C y un tiempo de duración de seis horas, distribuidas en dos fases de tres horas cada una con un tiempo de reposo de 24 h entre ambas. La siembra de los 23 genotipos de chile se realizó el 5 de julio del año 2019, depositando dos semillas por cavidad a una profundidad de 0.5 cm, cubriendo con una capa ligera de sustrato Peat moss humedecido. Posteriormente se procedió a la inoculación de consorcios.

Tabla 1. Porcentaje de emergencia a los 10 días después de la siembra, de 23 genotipos de Chile, bajo el efecto de consorcios microbianos.**Table 1.** Emergency percentage of 23 Chile genotypes 10 days after sowing, from various agricultural regions of the country under the effect of microbial consortia.

| Tipo de Chile | Genotipos | % emergencia | | | | altura (cm) | | | |
|---------------|--------------------------|--------------|------|------|------|-------------|----------|----------|----------|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T1 | T2 | T3 | T4 |
| Pasillas | 1. UAA/Ags. | 51def | 60b | 62b | 60b | 67(±2)de | 77(±1)ba | 75(±1)b | 79(±1)ab |
| | 2. Perales 1/Zac. | 52def | 62b | 63b | 67b | 65(±2)de | 78(±1)ba | 75(±1)b | 79(±1)ab |
| | 3. Perales 2/Zac. | 52def | 63b | 63b | 63b | 67(±2)de | 78(±1)ba | 75(±1)b | 80(±1)a |
| Anchos | 4. UAA 2008/Ags. | 53def | 61bc | 60bc | 60bc | 63(±3)de | 74(±1)bc | 73(±2)bc | 75(±1)b |
| | 5. AP Neek/SLP. | 55def | 63bc | 61bc | 63bc | 65(±2)de | 75(±1)b | 73(±2)bc | 74(±1)b |
| | 6. 3v/Zac. | 52def | 62bc | 62bc | 62bc | 62(±3)de | 74(±2)bc | 72(±2)bc | 75(±1)b |
| | 7. SR-2009/Dgo. | 51def | 63bc | 63bc | 63bc | 61(±1)ef | 74(±2)bc | 73(±2)bc | 75(±1)b |
| Guajillos | 8. Don Luis/SLP | 49ef | 57de | 58de | 59de | 58(±2)fg | 70(±2)cd | 69(±2)cd | 71(±2)cd |
| | 9. Perales/Zac. | 50ef | 58de | 59de | 59de | 57(±3)fg | 69(±3)cd | 70(±2)cd | 70(±2)cd |
| | 10. Mirasol 3v/Zac. | 51ef | 59de | 57de | 58de | 56(±3)fg | 71(±1)cd | 70(±2)cd | 72(±2)cd |
| | 11. Don Ramón/SLP | 49ef | 57de | 58de | 57de | 56(±3)fg | 71(±1)cd | 71(±2)cd | 73(±2)cd |
| Puya | 12. 91/SLP | 48ef | 55de | 56de | 55de | 48(±6)gh | 66(±3)de | 62(±5)de | 68(±2)de |
| | 13. Saladillo 1/Zac. | 49ef | 55de | 55de | 56de | 53(±1)gh | 65(±3)de | 63(±4)de | 67(±2)de |
| | 14. Saladillo 2/Zac. | 49ef | 56de | 57de | 54de | 51(±2)gh | 67(±2)de | 65(±2)de | 67(±2)de |
| | 15. Caudillo/Dgo. | 50ef | 56de | 55de | 56de | 56(±4)fg | 65(±4)de | 64(±2)de | 66(±2)de |
| Serrano | 16. Hib. Coloso/Tamps. | 52ef | 86a | 81a | 82a | 72(±2)cd | 81(±2)a | 80(±2)a | 83(±2)a |
| | 17. Hib. HS44/Tamps. | 51ef | 85a | 81a | 81a | 70(±2)cd | 80(±2)a | 79(±1)a | 83(±2)a |
| | 18. Hib. Centauro/Tamps. | 53ef | 84a | 81a | 80a | 71(±2)cd | 82(±4)a | 78(±1)a | 83(±2)a |
| Jalapeño | 19. Don Benito1/Tamps. | 60bcd | 87a | 87a | 85a | 72(±2)cd | 82(±2)a | 82(±2)a | 83(±2)a |
| | 20. Don Benito2/Tamps. | 69bcd | 85a | 84a | 87a | 72(±2)cd | 82(±4)a | 80(±1)a | 84(±2)a |
| | 21. Don Pancho/Tamps. | 60bcd | 87a | 85a | 86a | 77(±2)cd | 83(±3)a | 81(±2)a | 86(±4)a |
| | 22. Apache/Chih. | 61bcd | 84a | 85a | 85a | 71(±2)cd | 82(±3)a | 79(±1)a | 85(±3)a |
| | 23. Isabel/Chih. | 62bcd | 84a | 83a | 83a | 72(±2)cd | 82(±3)a | 82(±3)a | 87(±8)a |

T1= Testigo (Sin aporte nutrimental), T2= Consorcio de los seis HMA, T3= Consorcio de seis HMA más un consorcio de cuatro Rpcv, T4= Fertilización química a base una solución nutrimental. Literales diferentes entre tratamientos muestras significancia con Tukey $p < 0.05$.

Tratamientos de estudio

Los tratamientos de estudio fueron cuatro: T1= Testigo (Sin aporte nutrimental (agua)), T2= Consorcio = (mezcla) de los seis HMA, T3= Consorcio de seis HMA más el consorcio de cuatro Rpcv, T4= Fertilización química a base una solución nutrimental Long Ahston completa (Yépez-Hernández *et al.*, 2016). Se desarrollaron 5 repeticiones por tratamiento; cada repetición presentó 30 plantas; 600 plantas fue el total de unidades experimentales en el presente estudio.

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) fueron obtenidos de inóculos establecidos por el área de Microbiología de Suelos, del Programa de Edafología, en el Colegio de Posgraduados Campus Montecillo y las rizobacterias del Laboratorio de Bacteriología de la Universidad tecnológica de Torreón (UTT). Los hongos corresponden a seis cepas de *Rhizophagus intraradices* con las claves Zac-19, Ced-20, Tab-21, Mér-22, Pap-23 y Jal-24. Asimismo, se incluyeron cuatro

cepas de rizobacterias (Rpcv = Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal), tres del género *Pseudomonas* que corresponden a *P. lini*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter guillouiae* y una del género-especie *Aeromona caviae*.

Inoculación en la siembra con un consorcio de seis HMA y de las Rpcv

Acorde a Bécard y Piché (1992) se reprodujeron los HMA usando *Allium schoenoprasum* para obtener suficiente inóculo. El consorcio de los HMA se aplicó al momento de la siembra en concentraciones de 10 gramos de inóculo micorrízico por semilla sembrada depositada en los semilleros de unícel de 200 cavidades conteniendo el sustrato Peat moss más Agrolita; los 10 gr de inóculo micorrízico contuvo 1,788 esporas por 100 g de suelo húmedo.

Las cepas de Rpcv por separado, fueron cultivadas en caldo nutritivo a 26 °C durante 18 horas en agitación. La sus-

penión bacteriana se centrifugó durante 15 minutos a 7000 rpm. El pellet de cada rizobacteria se resuspendió en 20 mL de agua destilada estéril y se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-5} UFC/mL o bien hasta alcanzar una concentración celular de 1×10^5 UFC/mL de cada espécimen. Con una micropipeta, un mL de la dilución bacteriana de cada espécimen fue depositado en la semilla depositada en los semilleros de unisel de 200 cavidades conteniendo el sustrato Peat moss más Agrolita.

Condiciones de germinación y emergencia

Después de la inoculación, los semilleros de cada tratamiento, fueron cubiertos con polietileno negro por 48 hrs para conservar el contenido de humedad (100%) a una temperatura de 22 °C. Posteriormente, los semilleros se liberaron de la cubierta de polietileno y, durante 10 días se mantuvieron en los semilleros irrigándolos (a saturación) con una solución nutrimental química a base una solución nutrimental; la preparación de la solución nutritiva se basó en una solución química tipo Long Ashton completa (400 ml/charola) (Yépez-Hernández *et al.*, 2016), la que fue aplicada cada tercer día.

Trasplante a macetas e inoculación con zoosporas de *Phytophthora capsici*

A los 10 días después de la siembra, se desarrolló un trasplante de plántulas en macetas plásticas de dos litros (0.70 kg). El sustrato utilizado fue Peat moss y arena fina obtenida de río de la región esterilizado en una relación 40 y 20%, más Agrolita en un 40%. Al finalizar el trasplante, 12 hrs después, se procedió a realizar una nueva inoculación de los consorcios con base a los tratamientos indicados. La irrigación fue diaria a las macetas fue depositando 200 mL/día de la solución nutritiva previamente indicada durante 60 días a partir del trasplante.

Para la inoculación con *Phytophthora capsici*, se desarrollaron aislamientos puros de aquella donada por el Laboratorio agrícola del Colegio de Postgraduados en Montecillos; éstos se cultivaron en medio PDA (papa dextrosa agar) para su incremento masivo. Después de 15 días de crecimiento se elaboró el inóculo de la siguiente manera: en cajas Petri con 20 mL de agua destilada esterilizada se colocaron discos de medio de cultivo que contenían micelio de *P. capsici*; el material se incubó a 25 °C por tres días para la formación de esporangios y la posterior liberación de sus zoosporas al ubicar las cajas Petri a 12 °C por 30 min.; posteriormente, con la ayuda de un hemacitómetro se ajustó una suspensión de zoosporas a una concentración de 3×10^3 mL⁻¹. A los 11 días después de trasplante, las plantas de Chile correspondientes a los cuatro tratamientos de estudio fueron inoculadas con tres gramos de hojarasca estéril conteniendo 3×10^3 zoosporas de *P. capsici*, con 36 hrs de crecimiento. Las plantas se mantuvieron durante 60 días en invernadero en condiciones favorables de la enfermedad las cuales son: una temperatura de 25 + 5 °C y una humedad relativa de 80 + 5%. El riego de las plantas se mantuvo constante (cada 3 días) para todos los tratamientos (Ramírez-Villapudua y Romero-Cova, 1980).

Variables evaluadas

Las variables evaluadas en la etapa de semillero fueron: El número de plántulas emergidas en semillero (npes) a los 10 días después de la siembra. La altura de la plántula fue contabilizada a los 10, 28, 57 y 70 días después de la siembra.

El porcentaje de plantas muertas por ataque del hongo fitopatógeno (*P. capsici*), se llevó a cabo mediante una escala subjetiva, realizando revisiones, conteos y registro de las plantas muertas a los 14, 28, 36, 40 y 45 días después de la inoculación que mostraran marchitez, característico de la enfermedad en cuestión. Se realizaron en cada uno de los cuatro tratamientos de estudio. Las plantas afectadas, fueron trasladadas al laboratorio, para re-aislar el hongo *P. capsici*, e identificarlo con las claves Erwin y Ribeiro (1996), Martin *et al.* (2012) y Lamour *et al.* (2012).

Detección de células microbiológicas adheridas al sistema radicular de Chile

Para las Rpcv al finalizar el estudio (60 días después del trasplante), se seleccionaron cinco plántulas de los diferentes tratamientos; sus raíces previamente lavadas con agua destilada estéril, se cortaron para transferirse a un tubo Eppendorf con agua estéril y se agitaron durante 1 m, para provocar el desprendimiento de las bacterias adheridas a la raíz. De la solución resultante se tomaron 100 µL que se sembraron por dispersión en placa de medio OAB selectivo. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h para cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC). Esta prueba se realizó por triplicado.

Para el caso de *Rhizophagus intraradices* se llevó a cabo mediante su tinción con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970) y observación al microscopio electrónico de las estructuras características de esta asociación (hifas, arbusculos y vesículas). Se determinó el porcentaje de colonización mediante la técnica de McGonigle *et al.* (1990).

Se realizó un análisis microbiológico para apreciar la presencia del hongo de *P. capsici*, considerando la técnica de aislamiento previamente citada (*Trasplante a macetas e inoculación con zoosporas de Phytophthora capsici*).

Análisis estadístico

En el presente trabajo se aplicó un diseño completamente al azar. Se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias (Tukey $p < 0.05$). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa de cómputo SAS (SAS, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación en semillero: número de plántulas emergidas en la cámara germinadora

Al cabo de 10 días después de la siembra, los 23 genotipos de Chile agrupados en tipo Pasilla (3), Ancho (4), Guajillo (4), Puya (4), Serrano (4) y Jalapeño (5), presentaron porcentajes promedio de emergencia del 63% (± 1), 62.7% (± 1), 58.5% (± 1), 56.5% (± 1), 82.0% (± 3), y 84.0% (± 3), respectivamente. Al ser analizados de manera individual, sobresalieron los

cultivares designados numéricamente 19. Don Benito1/Tamps; 20. Don Benito2/Tamps.; 21. Don Pancho/Tamps.; 22. Apache/Chih.; y el 23. Isabel/Chih. con los porcentajes más altos en emergencia por arriba del 85% (Tabla 1); en siguiente orden resultaron los híbridos 16. Hib. Coloso/Tamps.; 17. Hib. HS44/Tamps.

Al desarrollar los análisis por grupo de inoculantes vs controles (T1= Testigo (agua)), T2= Consorcio = (mezcla) de los seis HMA, T3= Consorcio de seis HMA más el consorcio de cuatro Rpcv, T4= Fertilización química), los resultados arrojaron que el T2 y T4, se mostraron numéricamente superiores en comparación del T3 y con significancia con relación al T1 ($p < 0.05$).

Altura de la planta

El promedio de la altura obtenida al analizar los tratamientos por separado (23), los resultados indican que el mejor tratamiento fue el 23 (87 (± 8 cm)). Isabel/Chih a base de fertilización química. Sin embargo, éste no se mostró superior con $p < 0.05$ en comparación con los tratamientos 16 al 22 (Tabla 1), excepto aquellos considerados como testigo control (T1).

Por su parte cuando fueron agrupados en tipo Pasilla (3), Ancho (4), Guajillo (4), Puya (4), Serrano (4) y Jalapeño (5), se pudo apreciar que los de tipo serrano y jalapeño, fueron los que mostraron valores numéricos altos en comparación de los de tipo Pasilla (3), Ancho (4), Guajillo (4), Puya (4), respectivamente (Tabla 1).

Los resultados obtenidos con los encontrados por Cardona *et al.* (2008) muestran que las Rpcv (*Pseudomonas* sp.) por si solas mejoran el crecimiento de las plantas; en el estudio los mismos autores obtuvieron alturas de planta de glicófitas a los 20 días después de la inoculación. Gholami *et al.* (2009) y Bashan *et al.* (2009), alcanzaron un incremento de 21.31%, para la altura de planta cuando inocularon plantas de pimiento morrón con *Bacillus* sp. MA 12, con respecto al testigo a los 60 días después de la inoculación. Diversos estudios son los que destacan la capacidad de las Rpcv para favorecer la micorrización (Founoune *et al.*, 2002; Mediavilla *et al.*, 2015; Miransari, 2011) y promover el crecimiento de las plantas micorrizadas (Barman *et al.*, 2015; Frey-Klett *et al.*, 2007).

Ataque de *P. capsici* en plantas de chile a los 14, 28, 36, 40 y 45 días después de la inoculación

En el presente estudio, *P. capsici* a los 23 cultivares de chile en condiciones de invernadero, se encontró que a los 14 días después de la inoculación (ddi), al analizarse por grupos de inoculantes vs controles (T1= Testigo (agua)), T2= Consorcio = (mezcla) de los seis HMA, T3= Consorcio de seis HMA más el consorcio de cuatro Rpcv, T4= Fertilización química), los resultados arrojaron que el testigo y el de fertilización química, mostraron al inicio del estudio plantas con síntomas característicos de la enfermedad los cuales se distinguen porque aparecen manchas oscuras en el cuello de la raíz, que provoca que la planta se marchite y muera. Las plántulas

se marchitan y se pudren cuando la infección ocurre en los semilleros (Guigón-López y González-González, 2003). Por su parte los tratamientos a base de consorcios no mostraron síntoma alguno. A los 28 ddi, se observó que el tratamiento a base de HMA, fue el más susceptible en esta etapa, quedando en segundo orden el testigo control y el de fertilización química (Tabla 2); por su parte aquel a base de la coinoculación de ambos consorcios (MHA+Rpcv), se mantuvieron sin mostrar los síntomas de la enfermedad.

Al cabo de 36 ddi, el testigo control, manifestó un alto porcentaje de plantas muertas (50%) en comparación del T2 y el Tratamiento a base de fertilización química. Por su parte el tratamiento con ambos consorcios fue el menos afectado. Un similar comportamiento fue registrado a los 40 ddi, sobresaliendo como el más sano, el tratamiento a base de (MHA+Rpcv). El testigo control resultó el más afectado por el agente en estudio *P. capsici* (Tabla 2). Diversos estudios muestran que la protección de las plantas contra enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos (Gholami *et al.*, 2009; Lugtenberg *et al.*, 2009), puede ser favorecida por los HMA y las Rpcv, los cuales presentan un control biológico en contra de *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y otros agentes fitopatógenos (Kloepper *et al.*, 1978; Rai, 2001).

A los 45 ddi, se realizó la evaluación final del ataque de *P. capsici* en el desarrollo de las plantas de chile. Los análisis arrojaron que los genotipos o cultivares más susceptibles fueron los chiles tipo Jalapeños (95%), los tipo Puyas (62.5%) y los tipo Serranos (75%), mientras que los menos vulnerables fueron los Pasilla (37.5%), tipo Ancho (50%) y tipo Guajillo con 37.5% (Tabla 3). Se pudo apreciar que el T2 en los tipo Serrano, no repercutió en una protección a la planta; este comportamiento del T2, resultó similar para todos los

Tabla 2. Porcentaje de plantas muertas por ataque de *P. capsici* a los 14, 28, 36 y 40 días después de la inoculación (ddi), en plantas de chile bajo el efecto de consorcios de hongos micorrizicos y rizobacterias como control biológico.

Table 2. Percentage of plants killed by *P. capsici* attack, at 14, 28, 36 and 40 days after inoculation (dai), in a population of 600 chili plants under the effect of consortia of mycorrhizal fungi and rhizobacteria such as biologic control.

| | T1 (Testigo) % | T2 (HMA) % | T3 (HMA+Rpcv) % | T4 (Fertiliz. quím.) % | Total de plantas |
|--------------------------|----------------------|------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|
| Plantas muertas (14 ddi) | 2.5 | 0 | 0 | 2.5 | 2 |
| Plantas muertas (28 ddi) | 5 | 8 | 0 | 5 | 7 |
| Plantas muertas (36 ddi) | 50 | 32 | 7 | 5 | 30 |
| Plantas muertas (40 ddi) | 20 | 27 | 10 | 5 | 20 |
| Total | 77.5 | 67 | 17 | 17.5 | 59 |

ddi= Días después de inoculación; (Fertiliz. Quím.)= fertilización química.

Tabla 3. Porcentaje de plantas muertas por ataque de *P. capsici* a los 45 días después de la inoculación (ddi), en plantas de Chile bajo el efecto de consorcios de hongos micorrízicos y rizobacterias como control biológico.
Table 3. Percentage of plants killed by *P. capsici* attack, at 45 days after inoculation (dai), in a population of 600 chili plants under the effect of consortia of mycorrhizal fungi and rhizobacteria such as biologic control.

| Tipo Pasilla | Plantas muertas por ataque de <i>P. capsici</i> . Leo. 45 ddi (%) |
|--------------------------------|---|
| (T1) Control absoluto (%) | 15 |
| (T2) HMA (%) | 15 |
| (T3) HMA+Bpcv (%) | 2.5 |
| (T4) Fertilización química (%) | 27 |
| Tipo Ancho | |
| (T1) Control absoluto (%) | 15 |
| (T2) HMA (%) | 25 |
| (T3) HMA+Bpcv (%) | 7.5 |
| (T4) Fertilización química (%) | 25 |
| Tipo Guajillo | |
| (T1) Control absoluto (%) | 15 |
| (T2) HMA (%) | 10 |
| (T3) HMA+Bpcv (%) | 5 |
| (T4) Fertilización química (%) | 25 |
| Tipo Puya | |
| (T1) Control absoluto (%) | 35 |
| (T2) HMA (%) | 10 |
| (T3) HMA+Bpcv (%) | 7.5 |
| (T4) Fertilización química (%) | 43 |
| Tipo Serrano | |
| (T1) Control absoluto (%) | 24 |
| (T2) HMA (%) | 37 |
| (T3) HMA+Bpcv (%) | 7.5 |
| (T4) Fertilización química (%) | 75 |
| Tipo Jalapeño | |
| (T1) Control absoluto (%) | 55 |
| (T2) HMA (%) | 20 |
| (T3) HMA+Bpcv (%) | 10 |
| (T4) Fertilización química (%) | 55 |

ddi= Días después de la inoculación

restantes tratamientos y para el Testigo control. Lo contrario ocurrió con el T3, ofreciendo resultados favorecedores en comparación del T4 a base de fertilización química (Tabla3).

Los 23 cultivares de Chile en estudio, agrupados estos en los tipos Pasillas, Anchos, Guajillos, Puyas, Serranos y Jalapeños, evaluados en el presente estudio, muestran una respuesta favorable evitando una infección de *P. capsici* cuando

Tabla 4. Células Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) y esporas de consorcios de hongos micorrízicos y rizobacterias como control biológico, adheridas al sistema radicular de cultivares de Chile.

Table 4. Colony forming units (UFC/mL) and spores from mycorrhizal fungi and rhizobacteria as biological control adhered to chili plant cultivar radicular systems.

| Microorganismo de consorcio | (T2) HMA Número de esporas/ g suelo | (T3) HMA+Bpcv Número de esporas/ g suelo (Log ¹⁰) UFC/mL |
|--|-------------------------------------|--|
| <i>Rhizophagus intraradices</i> Zac-19 | 465±73 | 435±55 |
| <i>Rhizophagus intraradices</i> Ced-20 | 429±87 | 397±73 |
| <i>Rhizophagus intraradices</i> Tab-21 | 399±122 | 599±102 |
| <i>Rhizophagus intraradices</i> Mér-22 | 445±91 | 483±61 |
| <i>Rhizophagus intraradices</i> Pap-23 | 420±22 | 465±101 |
| <i>Rhizophagus intraradices</i> Jal-24 | 380±68 | 345±108 |
| <i>Pseudomonas lini</i> | nd | 4.00 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | nd | 3.99 |
| <i>Acinetobacter guillouiae</i> | nd | 4.06 |

nd: no determinado

éstos son coinoculados con HMA y Rpcv; resultados que concuerdan con aquellos de Frey-Klett *et al.* (2007) y Kloepper *et al.* (1978), citado por Rai, (2001), donde señalan la acción de "biocontrol" de *Phytophthora*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* figuran ciertos mecanismos como son la antibiosis, parasitismo, sideróforos, y resistencia sistémica inducida, principalmente (Gholami *et al.*, 2009; Lugtenberg *et al.*, 2009). Cabe indicar que aquellas plantas del tratamiento a base de fertilización química, resultaron con altos porcentajes de plantas infectadas por el fitopatógeno en estudio, lo cual fue evidenciado en las "pruebas de Koch" descrito en el apartado metodológico (Detección de células microbiológicas adheridas al sistema radicular de Chile).

Al finalizar el estudio, se pudo apreciar que las seis cepas del HMA *Rhizophagus intraradices* con las claves Zac-19, Ced-20, Tab-21, Mér-22, Pap-23, Jal-24 y, las cepas de Rpcv, de *Pseudomonas* y que corresponden a *P. lini*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter guillouiae* y una del género-especie *Aeromona caviae*, al ser analizados en las raíces de las plantas de los diferentes cultivares de Chile, se identificaron células y/o esporas de los microorganismos en estudio (Tabla 4).

CONCLUSIONES

La coinoculación de HMA y las Rpcv, promueven la emergencia de plántula y que, con base a las condiciones del presente estudio, redujeron el ataque del hongo *P. capsici*, en plantas de 23 cultivares de Chile en comparación a las plantas de los restantes tratamientos. Los cultivares de Chile tipo Pa-

silla y tipo Guajillo, presentaron la mayor resistencia al ataque de *P. capsici* Leo., cuando fueron inoculados con HMA+Rpcv, mientras que los chiles tipo Serrano, Puya y Jalapeño, fueron los de mayor susceptibilidad al ataque del hongo fitopatógeno. Estudios relacionados con un sistema de producción completo bajo las condiciones en las que es producido el cultivo de Chile, sugiere ser evaluado vs el sistema convencional en el control de *Phytophthora capsici*.

REFERENCIAS

Avelar, M.J.J. 1989. Intentos de Control de la Marchitez del Chile ocasionada por el hongo *Phytophthora capsici* Leonian en la región de Valsequillo, Puebla, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México. 66 p.

Barman, P., Singh, S.K., Patel, V.B., Singh, A.K., Nain, L. 2015. Synergistic interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza helper bacteria improving antioxidant activities in Troyer citrange and Cleopatra mandarin under low moisture stress. *Indian J. Hortic.* 72:1 33-37.

Bashan, Y., Bustillos J.J., Leyva, L. A., Hernández J.P., Bacilio M. 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils.* 42: 279-285.

Bécard, Y. Piché, I. 1992. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. *Methods Microbiol.* 24. 89e108.

Cardona, G., Peña-Venegas, C. P., Arcos, A. 2008. Occurrence of *Arbuscular micorrhizae* fungi in red pepper (*Capsicum sp.*) in the Amazonian region of Colombia. *Agronomía Colombiana* 26(3): 459-470

Castañón-Nájera, G., Latournerie-Moreno, L., Mendoza-Elos, M., Vargas-López, A., Cárdenas-Morales, H. Colección y caracterización de Chile (*Capsicum spp.*) en Tabasco, México. *Rev. Int. de Botánica Experimental.* 2008; 77: 189-202.

Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jenesen, J.B. 2002. Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* (NRRL30562) endophytic on *Kennedyanigriscans*. *Micorobiology* 148: 2675-2685.

Erwin, D.C., Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 562 pp.

Frey-Klett, P., Garbaye, J. The Mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 2007; 176: 22-36

Gholami, A., Shahsavani, S., Nizarat, S. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 49: 10-24.

Gholami, A., Shahsavani, S., Nizarat, S. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 2009; 49: 10-24.

Gilardi, G., Baudino, M., Moizio, M., Pugliese, M., Garibaldi, A., Gullino, M. L. 2013. Integrated management of *Phytophthora capsici* on bell pepper by combining grafting and compost treatment. *Crop Protection.* 53:13-19.

Goldberg, N. P. 1998. Chile pepper diseases. Agricultural Experimental Station. Circular No 549. College of Agriculture and Home Economics. New México State University. Las Cruces, New México, USA. 20 p.

Guigón-López, C., González-González, P. 2001. Estudio regional de las enfermedades del Chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 19(1):49-56.

Guigón-López, C., González-González, P. A. 2003. Selección de cepas nativas de *Trichoderma spp.* Con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras del crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología.* 22(1):117-124.

Hernández-Castillo, F.D., Lira-Saldívar, R.H., Gallegos-Morales, G., Hernández-Suárez, M., Solís-Gaona, S. 2014. Biocontrol de la marchitez del Chile con tres especies de *Bacillus* y su efecto en el crecimiento y rendimiento. *Revista Internacional de Botánica Experimental.* 83(1):49-55.

Kaiser, H.F. The application of electronic computers to factor analysis. *Educ. Psychological Meas.* 1960; 20: 141-151.

Kyung, S., Deok, J., Deok, K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria suppressive to phytophthora blight affect microbial activities and communities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum* L.) in the field. *Applied Soil Ecology.* 62(1):88-97.

Kyung, S., Chun, S., Deok, K. 2008. Biological control of phytophthora blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control.* 46(3):424-433.

Lamour, K.H., Stam, R., Jupe, J., Huitema, E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13 (4):329-337. doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00754

Lugtenberg, B., Chin-A-Woeng, T., Bloemberg, G. 2002. Microbe-Plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81: 373-383.

McGonigle, T.P., M.H. Miller, D.G. Evans, G.L. Fairchild, Swan, J.A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115:495-501.

Martin, F.N., Abad, Z.G., Balci, Y., Ivors, K. 2012. Identification and Detection of Phytophthora: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease* 96(8):1080-1103.

Mediavilla, V., M. Leupin., Keller, A. 2001. Influence of the growth stage of industrial hemp on the yield formation in relation to certain fibre quality traits. *Industrial Crops and Products.* 13(1):49-56.

Ozgonen, H., Erkilic, A. 2007. Growth enhancement and phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protection.* 26:1685-188.

Pérez, C., A., Chamorro, A.L. 2013. Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana de Ciencia Animal.* 5(2):439-462.

Pérez-Acevedo, C.E., J.C. Carrillo-Rodríguez., J.L. Chávez-Servia., C. Perales-Segovia., R. Enríquez Del V., Villegas-Aparicio, Y. 2017. Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del Chile en Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 8(2):281-293.

Phillips, J. M., Hayman, D.S. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-161.

Rai, M.K. 2001. Current advances in mycorrhization in

- micropropagation. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 37 158-167.
- Ramírez-Villapudua, J., Romero-Cova, S. 1980. Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo., agente causal de la marchitez del chile. *Agrociencia* 39:9-18.
- Ramírez-Mares, M.V., Hernández-Carlos, B. 2015. Plant-derived natural products from the American continent for the control of phytopathogenic fungi: a review. *Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences*, 3: 96-118.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D. 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*, 10. Doi:e0146021.
- SAS Institute. 2004. *SAS/STAT user's guide*. Version 6.12 SAS, Institute, Cary, N.C. U.S.A.
- Yépez-Hernández, F.J., Ferrera-Cerrato, A., Alarcón, J., Delgadillo-Martínez, J., Mendoza-López, M.R., García-Barradas, J. 2016. Fertilización nitrogenada en el crecimiento, contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de Albahaca. *Rev. Fitotec. Mex.* 29(1):33-40.

Antibacterial activity and acute toxicity study of standardized aqueous extract of *Randia monantha* Benth fruit

Estudio de actividad antibacteriana y toxicidad aguda de extracto acuoso estandarizado de fruto de *Randia monantha* Benth

Naida Juárez-Trujillo¹, Fredy Erubiel Tapia-Hernández², Mayvi Alvarado-Olivarez³, César I. Beristain-Guevara¹, Luz Alicia Pascual-Pineda¹, Maribel Jiménez-Fernández^{1*}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Universidad Veracruzana, Xalapa Veracruz, México.

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

³ Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

ABSTRACT

The fruit of *Randia monantha*, traditionally and empirically used in the preparation of a beverage as antivenom and for the treatment of various diseases has little scientific evidence regarding its antimicrobial properties and toxicity. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial effect of the *Randia monantha* pulp aqueous extract on acute toxicity in male Wistar rats, evaluated at different concentrations against pathogenic bacteria. The results of acute oral toxicity revealed no deaths with doses up to 5000 mg/kg body weight. The experimental animals showed no significant changes in the weight and behavior parameters evaluated with respect to the control treatment. Rats did not show significant changes in the hematological parameters, but doses of 5000 mg/kg body weight rats exhibited the appearance of yellow spots on kidney. The aqueous extract had no antimicrobial activity against pathogenic bacteria tested. These results suggest that the *Randia monantha* fruit aqueous extract can be used with some degree of safety by oral administration but should not be taken in high doses.

Keywords: Acute toxicity, Antimicrobial properties, Crucetillo, *Randia monantha*, Rats.

RESUMEN

El fruto de *Randia monantha* se utiliza tradicional y empíricamente en la preparación de una bebida como antiveneno y para el tratamiento de diversas enfermedades, pero hasta la fecha existe poca evidencia científica sobre sus propiedades antimicrobiológicas y toxicidad. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la administración del extracto acuoso de pulpa de *Randia monantha* sobre la toxicidad aguda en ratas Wistar macho y evaluar la actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones frente a bacterias patógenas. Los resultados de la toxicidad oral aguda no revelaron muertes en dosis de hasta 5000 mg/kg de peso corporal. Los animales de experimentación no mostraron cambios significativos en los parámetros de peso y comportamiento evaluados con respecto al tratamiento control. Las ratas no mostraron cambios significativos en los parámetros hematológicos, pero las ratas con dosis de 5000 mg/kg de

peso corporal mostraron la aparición de manchas amarillas en el riñón. El extracto acuoso no mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas de prueba. Estos resultados sugieren que el extracto acuoso de la fruta *Randia monantha* puede usarse con cierto grado de seguridad por administración oral, pero no debe tomarse en dosis altas.

Palabras clave: Toxicidad aguda, Propiedades antimicrobianas, Crucetillo, *Randia monantha*, Ratas.

INTRODUCTION

Stems, leaves and fruits of several *Randia* genus species contain compounds such as 1-nitropyrene, linoleic acid, palmitic acid, sterols, β -sitosterol, campesterol, oleanolic acid acetate, oleanolic acid-3- α -L-arabinoside, and mesembryanthemoidigenic acid, among others, which have been shown to confer biological, antioxidant and various pharmacological properties (Cano-Campos *et al.*, 2011; Kandimalla *et al.*, 2016; Lapikanon *et al.*, 1983). The *Randia monantha* Benth fruit, known as a "crucetillo" because of the cross shape in which the thorns are presented, is used as an antivenom beverage against poisonous animals and to which various pharmacological properties are attributed, since it is used as an anticancer, antidiabetic, antidiarrheal, to relieve stomachache and many other diseases (Gallardo-Casas *et al.*, 2012). Currently, the fruit is used in various liquors, predominantly: brandy, ethanol, and Jerez wine. However, it has been reported that the aqueous extract of the pulp and the seed of *Randia monantha* Benth have a higher concentration of polyphenolic compounds, such as chlorogenic acid, rutin, and 4-coumaric acid, which could contribute to their antioxidant activity and other attributed beneficial properties (Juárez-Trujillo *et al.*, 2018). On the other hand, there are reports that polyphenol compounds have antimicrobial activity, but there is little information in the literature about the inhibitory capability of *Randia monantha* on pathogenic bacteria. Thus, nowadays people consume it in large quantities and for long periods, considering that the administered dose depends on the bite or sting of the poisonous animal, or the severity of the disease (Mendez and Hernández, 2009). Although in tests conducted with saline artemia there are no toxic effects reported in this species, and as far as we know,

*Autores para correspondencia: Maribel Jiménez Fernández

Correo electrónico: maribjimenez@uv.mx

Recibido: 16 de junio de 2021

Aceptado: 24 de septiembre de 2021

there are no studies on its acute toxicity in experimental animals. Therefore, the objective of this study was to evaluate the acute toxicity of the aqueous extract of the *Randia monantha* fruit in a murine model (male Wistar rats) on behavioral parameters, macroscopic evaluation of liver and spleen, analysis of the pancreatic Langerhans islets, and a histopathological examination of liver, kidney, and pancreas tissue. In addition, we evaluated the effect of the aqueous extract at different concentrations on pathogenic bacteria.

MATERIAL AND METHODS

Obtaining the fruits

To obtain the sample, a batch of 100 fruits (5.73 kg) was selected at random, with a maturity index of 26.60. The fruits were collected at the 2018 January-March period in the town of Actopan, Veracruz, located at the latitude: 19°27'36'', longitude: 96°49'48'' west 1060 m.a.s.l. After harvest, fruits were washed and disinfected with 0.01% sodium hypochlorite. Manually obtained pulp (1.04 kg) was lyophilized until it became a powder. The taxonomic identification of the fruit was confirmed by biologist Manuel Carlos Durán Espinosa. A copy of the reference fruit, with Num. of herbarium copy: NJuárezT2 (XAL) was deposited in the Xalapa herbarium of the Institute of Ecology A. C (Juárez-Trujillo *et al.*, 2018).

Preparation of experimental animals

The experimental animals used were 21 male Wistar rats, weighing 300 - 359 g and between 3 to 5 months of age from of Neuroethology laboratory of the Universidad Veracruzana. Six groups of $n=3$ rats corresponding to the different concentrations (10, 100, 1000, 1600, 2900, and 5000 mg/kg weight body) and a control group (without administration) were randomly formed. The rats were housed in transparent plastic boxes, three rats per box inside the bioterium, with light / dark cycles of 12:12 h at a room temperature of 25 ± 2 °C, and a humidity between 50 - 60 %. The experimental animals carried a standard diet with water and pelletized food *ad libitum*. They were allowed seven days for acclimatization before the commencement of the research. In this study, all animals were handled in accordance with the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of Universidad Veracruzana based in the National Institutes of Health.

Acute toxicity study

The dried pulp was mixed at different concentrations with a solution of tween 20 (5%), propylene glycol (5%), and purified water. Doses were prepared according to guide 423, the Organization of Economic Co-operation and Development (OECD, 2001). The groups were administered with extract by intragastric cannulation in a single dose of 5000, 2900, 1600, 1000, 100, and 10 mg/kg body weight for each of the treatment groups, respectively, while the control group received only tween 20, propylene glycol and water used as a vehicle. LD₅₀ was estimated according to the guideline 423 from Organization of Economic Co-operation and Development (OECD, 2001).

The animals were monitored during the first 24 hours after cannulation with special emphasis on the first 30 minutes, and with 15-minute videos taken at 2, 4, 6, 8, 12, and 24 hours in search of apparent modification of toxicological behavior (Cavanaugh, 2003). The symptoms analyzed were mucus, ataxia, salivation, diarrhea, seizures, respiratory disorders, hyperactivity, and paralysis (Pérez, 2017). The weight of the rats was recorded daily for 15 days. On day 15, all rats used in the experimental procedures were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital (60 mg/kg).

A blood sample was obtained by cardiac puncture and collected in plastic tubes containing EDTA. Erythrocyte count, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet count, and leukocyte count were evaluated using a veterinary hematology analyzer (Abaxis Vatscan HM2). All rats were sacrificed on day 15 and subsequently perfused and dissected; the extraction and weighing of organs, liver, kidneys, pancreas, and spleen were performed.

Histopathology study

Selected organs, including pancreas, liver, kidney, and spleen of the treated and control animal groups, were fixed in 10 % buffered formalin in labeled bottles and subsequently processed for histological examination. The tissue was processed using an automated tissue processor (Leica 820, Germany) and embedded in blocks of paraffin. Stained tissue sections were examined under a light microscope (Leica DM 750, Germany). Number and area of Langerhans islets in the pancreas were determined in at least five islets per section at a 40x magnification. Full images of the selected Langerhans islets were obtained by photomicrographs with Adobe® Photoshop CS6 software, and their analysis was performed using the ImageJ Java® software in which the area, thickness, density, and volume data of the selected islets were obtained according to the methodology reported by Cavanaugh (2003). The numerical concentration of the cells in the islet was determined by manual counting by differential hematoxylin and eosin phloxine (H&E) staining (Coggehall, 1992; Mohammadi and Naik, 2012).

Antimicrobial activity of the aqueous extract of pulp of *Randia monantha* fruit

The *Randia monantha* pulp extract antimicrobial activity was evaluated using the broth dilution method. Active cultures of *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 43895), and *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) were prepared according to Balouri *et al.* (2016). For the above, dilutions were prepared at 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/mL in a liquid growth medium, distributed in tubes containing a volume of 2 mL. Subsequently, each tube was inoculated with a microbial inoculum prepared in the same medium, which was previously standardized to the McFarland scale of 0.5. Each tube was then shaken and incubated for 24 hours at 37 °C. After 24 h, the absorbance $\lambda= 600$ nm was read.

Statistical analysis

Analysis of variance was carried out to evaluate the results found in the different treatments with pulp extracts, and subsequently, the significant differences were assessed using the Fisher test with a level of significance $p \leq 0.05$, using Minitab program version 17, States United.

RESULTS

Body and organs weight gain

The results of the acute toxicity study indicated that the aqueous extract of the *R. monantha* pulp administered orally to rats at doses between 10-5000 mg/kg body weight in acute toxicity testing methodology did not cause death or significant toxicity in test animals, indicating that the LD₅₀ is greater than the doses administered. Table 1 shows that the groups corresponding to an administration of 2900 and 5000 mg/kg body weight presented a slight increase in weight that ranged from 0.25 to 7.94%. However, in relation to the weight of the organs, it was observed that the pancreas, liver, kidneys, and spleen did not show significant differences ($p > 0.05$) compared to the respective organs of the control treatment.

Behavior observations

Consistent with these results, the different treatment groups showed no significant difference in the evaluated clinical signs (mucus, ataxia, salivation, diarrhea, convulsions, hyperactivity, paralysis, and changes in breathing), compared to the control treatment.

Macroscopic evaluation of organs

External macroscopic analysis of liver, spleen, and pancreas did not reveal any alteration nor signs of toxicity, without visual differences with the control treatment, indicating the absence of toxicity. However, the kidneys of the group corresponding to an administration of 5000 mg/kg body weight showed yellow spots. The kidney histopathology examination revealed that the yellow areas presented a minor or no blood supply, with a notable decrease in erythrocytes and a decrease in blood flow than the kidney cuts of the control treatment (Figure 1).

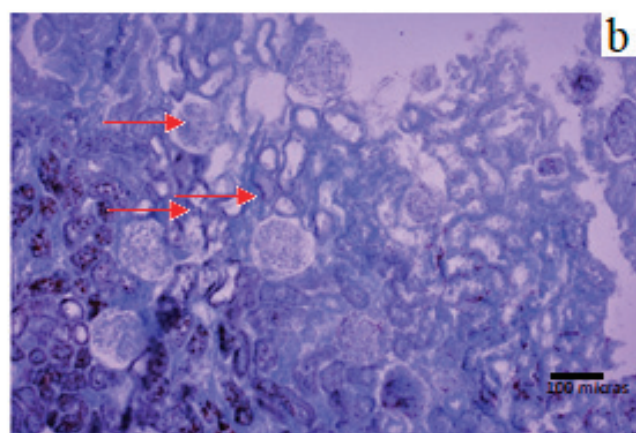
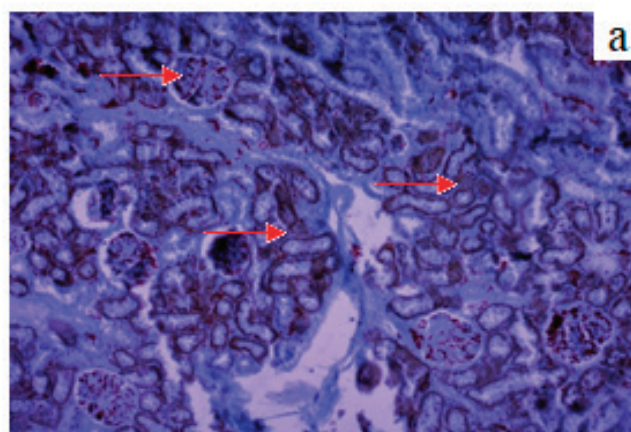


Figure 1. Kidney histological examination. A) Control treatment and B) Treatment with a dose of 5000 mg/kg of weight. The arrows point out the blood supply.

Figura 1. Examen histológico del riñón de A) Tratamiento de control y B) Tratamiento con dosis de 5000 mg/kg de peso. Las flechas señalan el aporte de sangre.

Hematology parameters analysis

The hematology parameters are summarized in Table 2. The hematological analysis of leucocytes, lymphocytes, monocytes, granulocytes, red blood cell, mean cell volume, hemoglobin, hematocrit, mean cell volume, mean corpuscular hemoglobin, erythrocyte distribution index, platelets,

Table 1. Increase in total body weight and in weight of the important vital organs of each treatment group.

Tabla 1. Incremento del peso corporal total y aumento del peso de los órganos vitales importantes de cada grupo de tratamiento.

| Doses (mg/kg Body weight) | Increased Total Body Weight (%) | Pancreas | Liver | Kidney | Spleen |
|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0 (Control) | 0.05 ± 0.02 ^a | 2.99 ± 0.85 ^a | 11.01 ± 0.73 ^a | 3.34 ± 0.41 ^a | 1.40 ± 0.19 ^a |
| 10 | 0.25 ± 0.19 ^a | 2.74 ± 0.68 ^a | 10.97 ± 1.33 ^a | 2.63 ± 0.27 ^a | 1.13 ± 0.24 ^a |
| 100 | 1.84 ± 0.86 ^b | 3.34 ± 0.69 ^a | 10.15 ± 1.76 ^a | 3.12 ± 0.71 ^a | 1.31 ± 0.23 ^a |
| 1000 | 5.73 ± 0.70 ^c | 3.04 ± 0.18 ^a | 9.97 ± 1.52 ^a | 2.91 ± 0.83 ^a | 1.57 ± 0.53 ^a |
| 1600 | 4.64 ± 0.68 ^{c-d} | 3.27 ± 1.01 ^a | 10.69 ± 1.60 ^a | 2.89 ± 0.24 ^a | 1.30 ± 0.09 ^a |
| 2900 | 5.39 ± 0.64 ^d | 3.80 ± 0.69 ^a | 12.45 ± 2.35 ^a | 3.04 ± 0.63 ^a | 1.25 ± 0.18 ^a |
| 5000 | 7.94 ± 0.87 ^e | 3.74 ± 0.23 ^a | 11.79 ± 2.34 ^a | 2.87 ± 0.30 ^a | 1.56 ± 0.12 ^a |

Mean ± SD, n = 3. Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 2. Hematological examination of treatments with different dosis (0-5000 mg/kg) of the standardized aqueous extract of *Randia monantha* pulp at 1, 7 and 15 days of administration.

Tabla 2. Examen hematológico de los tratamientos con diferentes dosis (0-5000 mg/kg) del extracto acuoso estandarizado de pulpa de *Randia monantha* a los 1, 7 y 15 días de administración.

| Day 1 Parameters | Dose (mg/kg weight) | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Control | 10 | 100 | 1000 | 1600 | 2900 | 5000 |
| Leucocytes (10 ⁹ /L) | 12.97±1.5 | 10.21±2.51 | 16.41±8.15 | 10.24±2.57 | 12.23±3.91 | 14.03±4.18 | 7.77±0.49* |
| Lymphocytes (10 ⁹ /L) | 8.80±0.72 | 7.88±1.43 | 9.62±1.29 | 7.82±2.48 | 8.34±4.15 | 6.42±1.59 | 5.59±1.26* |
| Monocytes (10 ⁹ /L) | 0.53±0.34 | 0.36±0.02 | 0.75±0.08 | 0.56±0.01 | 0.18±0.01 | 0.29±0.10 | 0.27±0.23 |
| Lymphocytes (%) | 68.00±2.40 | 76.16±3.26 | 64.96±19.11 | 75.33±7.03 | 64.93±15.34 | 49.70±26.3 | 71.56±11.42 |
| Monocytes (%) | 4.00±2.26 | 2.80±0.91 | 3.46±0.45 | 0.60±0.00 | 0.63±0.05 | 2.10±0.14 | 2.73±0.10 |
| Granulocytes (%) | 28.00±0.14 | 21.03±4.38 | 31.56±5.80 | 24.10±7.00 | 34.43±5.29 | 48.20±26.16 | 25.73±9.57 |
| Red blood cell (10 ¹² /L) | 9.07±0.35 | 9.00±0.27 | 8.35±1.69 | 9.04±0.31 | 8.71±0.12 | 9.86±0.01 | 9.42±0.83 |
| Hemoglobin (g/dL) | 17.50±0.00 | 17.40±0.30 | 16.10±2.87 | 17.36±0.20 | 16.76±0.81 | 19.30±0.56 | 18.43±0.55 |
| Hematocrit (%) | 52.69±1.25 | 53.54±1.66 | 50.75±9.51 | 55.27±1.95 | 51.19±3.89 | 55.66±1.37 | 51.84±3.83 |
| Mean cell volumen (fl) | 58.50±3.53 | 59.33±0.57 | 60.66±1.52 | 61.33±0.57 | 58.66±3.78 | 56.50±0.70 | 55.00±2.64 |
| Mean corpuscular hemoglobin (g/dL) | 33.15±0.77 | 32.56±0.49 | 31.80±0.36 | 31.43±0.87 | 32.83±0.92 | 34.60±0.14 | 35.66±1.76 |
| Erythrocyte distribution index (%) | 17.75±0.49 | 16.70±0.20 | 18.10±1.31 | 16.50±0.40 | 18.60±0.95 | 16.45±0.35 | 16.60±0.96 |
| Platelets (10 ⁹ /L) | 620.50±47.37 | 587.00±60.62 | 504.66±31.07 | 754.33±127.44 | 814.33±88.66 | 493.00±15.36 | 20.66 ± 2.03* |
| Mean platelet volumen (fl) | 6.65±0.35 | 6.56±0.11 | 6.66±0.15 | 6.63±0.11 | 6.76±0.41 | 6.90±0.42 | 6.63±0.37 |
| Triglycerides (mg/dL) | 100.19±27.83 | 95.80±31.88 | 95.80±14.71 | 62.67±5.53 | 104.99±18.60 | 143.11±45.62 | 73.83±27.29 |
| Glucose (mg/dL) | 52.79±12.29 | 57.89±16.12 | 54.52±15.44 | 74.47±7.89 | 104.23±36.60* | 110.40±23.70* | 124.08±23.83* |
| Cholesterol (mg/dL) | 80.19±5.80 | 76.90±6.98 | 91.40±10.44 | 75.36±9.05 | 89.66±12.83 | 76.08±9.83 | 86.95±21.16 |
| Day 7 | | | | | | | |
| Leucocytes (10 ⁹ /L) | 15.57±4.62 | 10.39±2.26 | 16.41±8.15 | 10.24±2.57 | 12.23±3.92 | 10.35±1.01 | 14.38±7.82 |
| Lymphocytes (10 ⁹ /L) | 9.20±0.86 | 7.88±1.43 | 9.62±1.29 | 7.81±2.49 | 8.34±4.15 | 7.78±0.32 | 5.47±1.18* |
| Monocytes (10 ⁹ /L) | 0.49±0.25 | 0.26±0.02 | 0.75±0.09 | 0.16±0.01 | 0.18±0.01 | 0.13±0.02 | 0.48±0.05 |
| Lymphocytes (%) | 61.40±11.55 | 76.16±3.26 | 64.96±19.11 | 75.33±7.03 | 64.93±15.34 | 75.75±10.53 | 247.63±73.57 |
| Monocytes (%) | 3.30±0.20 | 2.80±0.91 | 3.46±0.45 | 0.60±0.00 | 0.63±0.05 | 1.30±0.98 | 2.96±0.59 |
| Granulocytes (%) | 35.26±12.58 | 21.03±4.38 | 31.56±15.80 | 24.10±7.00 | 34.43±15.29 | 23.00±9.45 | 49.43±6.27 |
| Red blood cell (10 ¹² /L) | 8.80±0.52 | 9.00±0.27 | 8.35±1.69 | 9.04±0.31 | 8.71±0.12 | 9.62±0.35 | 9.74±0.48 |
| Hemoglobin (g/dL) | 17.00±0.86 | 17.40±0.30 | 16.10±2.87 | 17.36±0.20 | 16.76±0.81 | 18.75±1.34 | 18.33±0.73 |
| Hematocrit (%) | 50.01±4.73 | 53.54±1.66 | 50.75±9.51 | 55.27±1.95 | 51.19±3.89 | 53.46±4.47 | 51.99±3.20 |
| Mean cell volumen (fl) | 57.00±3.60 | 59.33±0.57 | 60.66±1.52 | 61.33±0.57 | 58.66±3.78 | 55.50±2.12 | 53.66±2.08 |
| Mean corpuscular hemoglobin (g/dL) | 34.03±1.62 | 32.56±0.49 | 31.8±0.36 | 31.43±0.87 | 32.83±0.92 | 35.1±0.56 | 35.23±0.80 |
| Platelets (10 ⁹ /L) | 816.00±34.02 | 587.00±60.62 | 504.66±31.80 | 754.33±124.44 | 814.33±88.66 | 896.50±255.36 | 304.66±67.68* |
| Platelet (%) | 0.53±0.02 | 0.38±0.04 | 0.33±0.02 | 0.50±0.09 | 0.55±0.09 | 0.62±0.14 | 0.14±0.02* |
| Platelet distribution width (%) | 31.03±0.28 | 32.16±0.45 | 31.66±0.95 | 31.53±0.57 | 31.70±0.86 | 32.6±0.56 | 33.83±3.35 |
| Triglycerides (mg/dL) | 90.61±24.95 | 113.77±21.85 | 135.32±4.79 | 113.97±41.00 | 103.11±7.85 | 85.62±14.39 | 73.05±7.28 |
| Glucose (mg/dL) | 59.00±19.75 | 82.14±10.44 | 60.51±16.15 | 65.96±15.15 | 67.63±14.05 | 128.36±10.63* | 116.00±20.22* |
| Cholesterol (mg/dL) | 47.09±11.17 | 52.90±11.11 | 50.20±4.66 | 50.87±9.00 | 48.85±2.44 | 44.93±1.71 | 39.67±7.49 |
| Day 15 | | | | | | | |
| Leucocytes (10 ⁹ /L) | 15.30±2.95 | 10.05±1.79 | 12.41±0.60 | 11.11±1.18 | 12.73±5.12 | 10.14±0.71 | 8.01±3.29* |
| Lymphocytes (10 ⁹ /L) | 9.89±1.28 | 7.01±0.19 | 9.08±0.50 | 8.25±1.69 | 7.78±3.57 | 8.53±0.73 | 5.58±2.21 |
| Monocytes (10 ⁹ /L) | 0.48±0.02 | 0.19±0.03 | 0.25±0.01 | 0.45±0.06 | 0.44±0.01 | 0.05±0.00 | 0.22±0.02 |
| Lymphocytes (%) | 65.86±11.61 | 70.90±10.12 | 73.40±7.29 | 73.76±8.21 | 60.56±11.21 | 84.10±1.27 | 70.03±7.03 |
| Monocytes (%) | 3.06±0.92 | 1.66±0.84 | 1.96±0.36 | 4.26±0.80 | 4.36±6.43 | 0.60±0.00 | 4.56±0.78 |

| Parameters | Dose (mg/kg weight) | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| | Control | 10 | 100 | 1000 | 1600 | 2900 | 5000 |
| Granulocytes (%) | 30.40±10.98 | 27.43±8.30 | 24.63±4.93 | 21.96±4.50 | 35.06±5.65 | 15.40±127 | 25.46±8.98 |
| Red blood cell (10 ¹² /L) | 8.80±0.33 | 9.91 0.13 | 10.10±0.74 | 8.94±0.41 | 8.86±0.09 | 8.98±0.55 | 9.00±0.49 |
| Hemoglobin (g/dL) | 16.06±0.66 | 19.16±0.36 | 19.26±0.96 | 18.53 0.87 | 17.50±1.01 | 17.40±0.56 | 17.36±0.66 |
| Hematocrit (%) | 49.81±2.52 | 59.36±0.61 | 59.99±4.18 | 56.42±2.57 | 53.74±2.54 | 49.19±1.56 | 49.03±2.56 |
| Mean cell volumen (fl) | 56.66±2.08 | 60.00±0.00 | 59.33±1.52 | 63.00±0.00 | 60.66±3.05 | 55.00±1.41 | 54.33±2.30 |
| Mean corpuscular hemoglobin (g/dL) | 32.26±1.92 | 19.33±0.25 | 19.10±0.45 | 32.80±0.69 | 32.50±1.44 | 35.45±0.07 | 35.36±0.90 |
| Platelets (10 ⁹ /L) | 451.33±46.98 | 586.66 101.07 | 552.66±55.62 | 625.33 87.84 | 566.00±40.18 | 951.00±178.00 | 504.33±83.31 |
| Platelet (%) | 0.29±0.02 | 0.38±0.05 | 0.37±0.03 | 0.43 0.06 | 0.39±0.08 | 0.65±0.11 | 0.34±0.06 |
| Platelet distribution width (%) | 33.66±4.43 | 32.13±0.90 | 32.46±0.23 | 32.00±0.23 | 32.43±0.87 | 32.40±0.28 | 32.16±0.45 |
| Triglycerides (mg/dL) | 89.02±32.93 | 113.83±41.49 | 121.33±21.28 | 113.25±40.87 | 105.74±34.24 | 121.49±21.17 | 89.34±49.82 |
| Glucose (mg/dL) | 67.63±29.75 | 59.88±19.67 | 66.14±16.32 | 66.14±16.32 | 80.94±2.11 | 128.94±17.74* | 131.69±20.20* |
| Cholesterol (mg/dL) | 44.49±6.06 | 60.69±7.22 | 48.74±11.06 | 61.32±11.96 | 53.14±6.54 | 42.21±3.66 | 39.62±2.35 |

Values are expressed as mean ± SD, n=3.

*Significant differences with the control treatment, *p* < 0.05.

mean platelet volume, and platelet distribution revealed no significant differences (*p* > 0.05) in relation to the control treatment and the days analyzed, the values were within the range considered normal (Tasić *et al.*, 2021; Nagamma *et al.*, 2019; Dantas *et al.*, 2006). The samples did not show significant differences (*p* > 0.05) in the triglycerides and cholesterol concentration with the control group, which should be considered in treating dyslipidemias. Treatments with a dose between 1600 and 5000 mg/kg of body weight exhibited at time zero (first day of administration) had an increase in glucose concentration (116-131.69 mg/dL) compared to the control group (62.79-77.63 mg/dL). However, these values are in the range of values considered normal for laboratory animals (Lapchik *et al.*, 2017).

Histopathology examination of pancreatic cells

The size, area, diameter, and volume of the Langerhans islet of the different treatments did not show significant differences (*p* > 0.05) (Table 3), which is important since its parameters directly influence the maintenance of glucose in the blood and their alteration is related to diabetes (Jo *et al.*, 2007). However, a significantly lower concentration of langerhans islets (643 cell/mm²) was observed in the 5000 mg/kg body weight treatment with compared to the other treatments. The groups that were administered 10, 100, 1000, 1600 and 2900 mg/kg body weight of extract exhibited a concentration of cells in the Langerhans islets that varied from 2008 to 3146 cells/mm², without significant differences (*p* > 0.05) with the control treatment (3100 cells/mm²). In contrast, the treatment of 5000 (643 cells / mm²) mg/kg body weight, showed a significant decrease in the number of cells in relation to the control treatment. Consistent with these results, the pancreas cells of the group administered with 5000 mg/kg body weight of extract showed a lower number of cells (alpha, beta, and delta) in the Langerhans islets compared to the control group (Figure 2).

Antimicrobial properties of aqueous extract

The antimicrobial effects of the *Randia monantha* fruit aqueous extract against Gram (-) and Gram (+) bacteria are shown in Table 4. It can be seen that the aqueous extracts did not present dose-dependent antimicrobial activity in the test concentration range (0.5-2.0 mg/mL) against Gram (+) bacteria, nor Gram (-) test bacteria. These results were similar to those reported for the methanol and ethanol extract of *Randia aculeata* against *Mycobacterium bovis* (García-Cruz, 2018), but different from those reported for the crude extract

Table 3. Cell concentration and morphological parameters of the Langerhans islets of each of the treatments.

Tabla 3. Concentración celular y parámetros morfológicos de los islotes de Langerhans de cada uno de los tratamientos.

| Groups (mg/body weight) | Cell concentration / mm ² | Central islet perimeter (µm) | Central islet area (µm ²) | Islet diameter (µm) | Cell number |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 0 (Control) | 3146 ± 724 ^b | 2436 ± 552 ^a | 255284 ± 49380 ^{ab} | 183.3 ± 50.35 ^a | 780 ± 81 ^{b,c} |
| 10 | 2984 ± 296 ^b | 2225 ± 691 ^a | 274342 ± 11183 ^{ab} | 233.3 ± 86.24 ^a | 969 ± 57 ^{b,c} |
| 100 | 2585 ± 322 ^b | 2412 ± 277 ^a | 348403 ± 71744 ^b | 243.3 ± 28.91 ^a | 885 ± 93 ^{b,c} |
| 1000 | 2622 ± 1000 ^b | 2279 ± 696 ^a | 237570 ± 67146 ^{ab} | 196.6 ± 5.77 ^a | 621 ± 30 ^b |
| 1600 | 3311 ± 733 ^b | 2013 ± 156 ^a | 230044 ± 23702 ^{ab} | 210.0 ± 26.53 ^a | 731 ± 88 ^b |
| 2900 | 2008 ± 510 ^b | 1748 ± 228 ^a | 178307 ± 52620 ^a | 186.7 ± 49.37 ^a | 375 ± 158 ^{ab} |
| 5000 | 643 ± 412 ^a | 2054 ± 489 ^a | 283802 ± 10467 ^{ab} | 206.7 ± 20.81 ^a | 174 ± 109 ^a |

Mean ± SD, n = 3. Different letters in the same column indicate significant differences (*p* < 0.05).

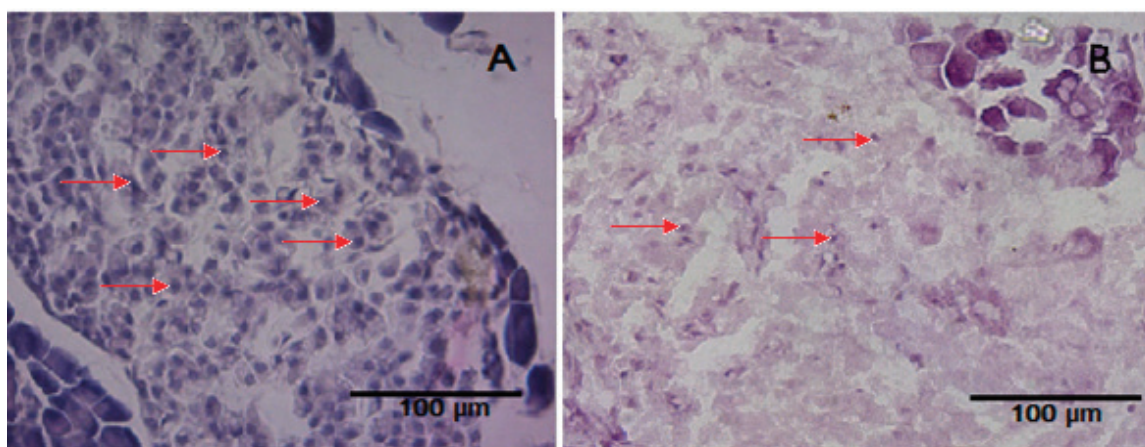


Figure 2. Pancreas histological examination. A) Control treatment and B) Treatment with a dose of 5000 mg/kg of weight. The arrows point out the Langerhans beta cells.

Figura 2. Examen histológico del páncreas. A) Tratamiento de control y B) Tratamiento con dosis de 5000 mg/kg de peso. Las flechas señalan las células beta de Langerhans.

Table 4. Antibacterial activity of aqueous extract of *Randia monantha* fruit.

Tabla 4. Actividad antibacteriana del extracto acuoso de fruto de *Randia monantha*.

| Pathogenic bacteria | Control | Dose (mg/mL) | | | |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 0.18 ± 0.01 ^a | 0.28 ± 0.04 ^b | 0.32 ± 0.05 ^{ab} | 0.42 ± 0.09 ^{bc} | 0.53 ± 0.03 ^c |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 0.59 ± 0.02 ^d | 0.36 ± 0.01 ^a | 0.41 ± 0.01 ^b | 0.44 ± 0.03 ^{bc} | 0.47 ± 0.01 ^{cd} |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0.33 ± 0.05 ^b | 0.24 ± 0.05 ^a | 0.23 ± 0.03 ^a | 0.37 ± 0.05 ^b | 0.41 ± 0.03 ^b |
| <i>Escherichia coli</i> | 0.21 ± 0.04 ^a | 0.30 ± 0.04 ^b | 0.31 ± 0.05 ^b | 0.39 ± 0.03 ^{bc} | 0.46 ± 0.03 ^c |

Mean ± SD, n = 3. Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

of *Randia dumetorum*, which exhibited significant antimicrobial activity (Kumar *et al.*, 2006).

DISCUSSION

In accordance with the OECD criteria under the regulation established by the Globally Harmonized System (GHS) and classification labeling for chemical substances and mixtures, substances with $LD_{50} > 5000$ mg/kg body weight are category 5 or classified as unclassified (OECD, 2001), suggesting that the concentrations tested in this study do not represent a toxic risk. Similarly, according to Hogde and Sterner (2005), scale compounds with LD_{50} between 5000-15000 mg/kg body weight are considered as practically non-toxic substances. The test animals showed weight gain directly proportional to the extract concentration administered, which could be due to the high concentration of sugars present in the pulp of *Randia monantha* Benth (Juarez-Trujillo *et al.*, 2018). This, since the increase in weight regularly relates to alterations in the macronutrient metabolism such as carbohydrates, proteins or fat, and even to hydromineral, or intracellular and extracellular deregulation and these nutrients play an appropriate role in physiological functions (Ezeonwumelu *et al.*, 2011). In turn, it has been reported that changes in the weight of the organs are an important and

sensitive parameter for the detection of harmful toxicological effects that are often associated with the administration of a chemical substance toxic to the organism (Sellers *et al.*, 2007). Despite the increase in body weight, the weight of pancreas, liver, kidneys, and spleen did not show a significant increase with respect to the weight of these organs in the control group. This corroborates that the concentrations tested in this study were not toxic to the organism, since an increase in the weight of the organs suggests the appearance of hypertrophy while the decrease suggests atrophy or necrosis in the target organ (Teo *et al.*, 2002).

Hematological parameters are perceptual markers of physiological changes in the health and toxicological status of test animals. The hematological profile suggested no changes in the count of red blood cells, leukocytes, and hemoglobin after the 0, 7, and 15 days of testing compared to the control treatment, suggesting that the aqueous extract has no influence on the hematopoiesis pathway. These results also demonstrated no significant changes in the lipid profile values in the range of tested concentrations, suggesting that this extract does not influence the lipid profile. In turn, the blood test revealed a significant increase in glucose concentration, which is possible since the *Randia monantha* pulp is rich in reducing sugars and total carbohydrates, which explain the increase in blood glucose and changes in the co-

loration of Langerhans cells. However, it has been reported that the soluble melanins and antioxidants present in *Randia echinocarpa* are a potential resource for type II diabetes treatment (Cuevas-Juarez *et al.*, 2014) and that the aqueous extract of *Randia nicotica* had satisfactory efficacy in glyce-mic control in diabetic rats (Alamin *et al.*, 2015). It is possible that these differences between the biochemical parameters regarding the antidiabetic effect reported in other species are due to the complexity of the phytochemical compounds present in the aqueous extract.

In general, the human body has several essential organs that are vital and with specific functions, such as liver, pancreas, and kidney, each of them has different functions, either in the metabolism of intake, in the regulation of certain hormones and/or in the excretion of waste products (Umale *et al.*, 2013). Therefore, to know the toxicity of a substance it is essential to know the state of these vital organs. In the histo-pathological study, we observed that the pancreas and liver in all treated groups showed no changes at the macroscopic and cellular level in comparison to the control. However, the macroscopic observation of kidneys from the treatment administered with high doses revealed yellow spots, and histopathology analysis exhibited a noticeable lesser blood supply in the area corresponding to the yellow spots. There are previous reports indicating that the administration of certain extracts can cause hyperemia, inflammation, and kidney damage since this is an organ responsible for disposing of chemical compounds and is more sensitive to damage by xenobiotic compounds (Saleen *et al.*, 2017; Meilian *et al.*, 2019).

On other hand, oxidative stress, inflammation, and apoptosis have been reported to be responsible for the degeneration of pancreatic islets, which could negatively affect circulating insulin level and result in a persistent hyperglycemia (Nna *et al.*, 2018). All this is a critical parameter to consider in the use of *Randia monantha* Benth extract, since beta cells are responsible for insulin secretion (Levetan, 2010). Thus, our results suggest that at these concentrations, the oral intake of this extract could have a negative health effect, which is a critical factor in the intake of this fruit, considering that people consume it in excess among other things as a remedy for diabetes.

In turn, the aqueous extract did not have an antimicrobial effect against the test pathogenic bacteria, possibly due to the high content of sugars present in the sample, which are a good source of carbon for the bacteria. However, it is necessary to consider other factors such as the concentration of the extract and the incubation time that affect the bacterial effect of the extracts (Othmen *et al.*, 2020).

CONCLUSIONS

According to the hematological parameters obtained in this study, the administration of the *R. monantha* extract in the range of 10-5000 mg/kg body weight concentrations, does not present acute toxicity considering that there was no death in the different experimental groups, with LD₅₀ greater than the administered dosis, corresponding to class

5 according to the OECD without toxicity. In general, the experimental organisms did not present significant differences in the hematological analyzes with most of the treatments, and all were within the range considered normal. This was consistent with the microscopic analysis in which doses greater than 2900 mg/kg body weight, caused damage to the pancreas, presenting a decrease mainly in beta cells in the Langerhans islets, in addition to generating alteration in blood supply to the kidneys. According to the LD₅₀ and the absence of mortality, the aqueous extract administered orally may indicate that it can be used with some safety degree for diabetes treatment. The microbiological analysis revealed that the extract does not have antimicrobial activity against some pathogenic bacteria and, on the contrary, favors their growth. Therefore, further studies are needed to establish a safe protocol for human clinical trials.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Veracruzano Council for Scientific Research and Technological Development (COVEICYDET) for their support for the realization of this project.

REFERENCES

- Alamin, M.A., Yagi, A.I. and Yagi, S.M. 2015. Evaluaticon of antidiabetic activity of plant used in Waster Sudan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(5): 395-402.
- Balouri M., Sadiki M. and Koraichi I.S. 2016. Methods for *in vitro* evaluation antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6: 71-79.
- Cano-Campos M., Díaz S., Uribe M., López G., Montes J., Paredes O. and Delgado F. 2011. Bio-guided fractionation of the antimutagenic activity of methanolic extrac from the fruit of *Randia echinocarpa* (Sessé et Mociño) against 1-nitropyrene. *Food Research International*. 44: 2087-3093.
- Cavanaugh, B. 2003. *Nurse's Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. FA Davis Company, Philadelphia.
- Coggeshall, E. 1992. A consideration of neural counting methods. Agosto 2019, de Biomedical Institute.
- Dantas, J.A., Ambiel, C.R., Cuman, R.K.N., Baroni1, S. and Bersani-Amado, C.A. 2006. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Health Science*. 28: 165-170.
- Ezeonwumelu, J., Julius, A., Muhoho, C., Ajayi, A., Oyewale, A. and Tanayen, J. 2011. Biochemical and histological studies of aqueous extract of *Bidens pilosa* leaves from Ugandan Rift Valley in rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2: 302-209.
- Gallardo-Casas, Guevara-Balcázar, G., Morales-Ramos, E., Tadeo-Jiménez Y., Gutiérrez Flores, O., Jiménez-Sánchez, N., Valadez-Omaña, M.T. and Castillo-Hernández, M.C. 2012. Ethnobotanic study of *Randia aculeata* (Rubiaceae) in Jamapa, Veracruz, Mexico, and its anti-snake venom effects on mouse tissue. *El Diario de Animales Venenosos y las Toxinas Incluyendo Enfermedades Tropicales*. 3(18): 287-294.

- García-Cruz, N. 2018. Obtaining extracts from the fruit of "cruetillo" (*Randia aculeate*) and evaluating its effects on the growth of *Microbacterium bovis*. Thesis, Universidad Autónoma de México.
- Hodge, A. and Sterner, B. 2005. Toxicity Classes. In: Canadian Center for Occupational Health and Safety. <http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/id50.htm>
- Jo, J., Choi, M.Y. and Koh, D.S. 2007. Size distribution of mouse Langerhans islets. *Biophysical Journal*. 89(3): 2655-2666.
- Juárez-Trujillo, N., Monribot, J., Alvarado, M., Luna, G. and Jiménez M. 2018. Phenolic profile and antioxidative properties of pulp and seeds of *Randia monantha* Benth. *Industrial Crops and Products*. 24: 53-58.
- Kandimalla, R., Kalita, S., Saikia, B., Choudhury, B., Singh, Y., Kalita, K., Dash, S. and Kotoky, J. 2016. Antioxidant and hepatoprotective potentiality of *Randia dumetorum* Lam. leaf and bark via inhibition of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Frontiers in Pharmacology*. 7: 205.
- Kumar, V.P., Chauhan, N.S., Padh, H. and Rajani, M. 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 107(2): 182-188.
- Lapchik, V.B.V., Mattaraia, V.G.M. and Ko, G.M. 2017. *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*, 2a. ed. Atheneu.
- Lapikanon, P., Tovivich, P., Woo, W.S. and Choi, J.S. 1983. Phytochemical study on *Randia siamensis*. *Archives of Pharmacol Research*. 6(1): 29-33.
- Levetan, C. 2010. Distinctions between islet neogenesis and b-cell replication: Implications for reversal of Type 1 and 2 diabetes. *Journal of Diabetes*. 2: 76-84.
- Meilian, Y., Zihuan, W., Yudan, W., Guoyin, K., Guy, S. and Shengbao, C. 2019. Acute and subacute toxicity evaluation of ethanol extract from aerial parts of *Epigynum auritum* in mice. *Food Chemistry and Toxicology*. 131: 110534
- Méndez, L.M. and Hernández, M.R. 2009. Evaluación de la toxicidad del fruto de *Randia monantha* Benth. *Revista Medica de la Universidad Veracruzana*. 9(S1): 42-45.
- Monammadi, J. and Naik, P.R. 2012. The histopathologic effects of *Morus alba* leaf extract on the pancreas of diabetic rats. *Turkish Journal of Biology*. 36: 211-216.
- Nagamma, T., Konuri, A., Nayak, C.D., Kamath, S.U., Udupa, P.E.G. and Nayak, Y. 2019. Dose-dependent effects of fenugreek seed extract on the biochemical and haematological parameters in high-fat diet-fed rats. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 14, (4): 383-389.
- Nna, V.U., Bakar, A.B., Md Lazin, M.R.M.L. and Mohamed, M. 2018. Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chemistry and Toxicology*. 120: 305-320.
- OECD. 2001. "Guidelines for the testing of chemicals / section 4: Health effects test no. 423: Acute oral toxicity - Acute toxic class method," Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Othmen, K.B., Elfalleh, W. García-Beltrán, J.M., Esteban, M.A. and Haddad, M. 2020. An in vitro effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) leaf extract on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocyte activities. Antioxidant, cytotoxic and bactericidal properties. *Fish and Shellfish Immunology*. 99: 35-43.
- Pérez, S. 2017. Toxicidad por administración continua (90 días) del extracto clorofórmico de *Calea urticifolia* (Juanislama) en ratones de laboratorio. (Tesis de licenciatura). Universidad del Salvador.
- Saleen, U., Amin, S., Ahmad, B., Azeem, H., Anwar, F. and Mary, S. 2017. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. Roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicology Reports*. 4: 580-585.
- Sellers, R.S., Morton, D., Michael, B., Roome, N., Johnson, J.K., Yano, B.L., Perry, R. and Schafer, K. 2007. Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicology Pathology*. 35: 751-755.
- Tasić, T., Lozić, M., Glumac, S., Stanković, M., Milovanovich, I., Djordjević, D.M., Trbović, A.M., Japundžić-Žigon, N. and De Luka, S.R. 2021. Static magnetic field on behavior, hematological parameters and organ damage in spontaneously hypertensive rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 207: 111085.
- Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A. and Khetani, V. 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. *Toxicology Journal*. 179 (3): 183-196.
- Umale, S., Deck, C., Bourdet, N., Dhumane, P., Soler, L., Marescaux, J. and Willinger, R. 2013. Experimental mechanical characterization of abdominal organs: liver, kidney & spleen. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 17: 22-33.

Bioactive compounds identification and physicochemical characterization from *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck cladodes flour

Identificación de compuestos bioactivos y características fisicoquímicas de la harina de cladodios de *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck

Héctor Enrique Fabela-Illescas¹, Marisol Patricia Castro-Mendoza¹, Efigenia Montalvo-González², Luis Miguel Anaya-Esparza³, Apolonio Vargas-Torres¹, Gabriel Betanzos-Cabrera⁴, Juan Pablo Hernández-Uribe^{1*}

¹ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Av. Universidad Km 1, Rancho Universitario, C.P. 43600, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

² Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, División de Estudios de Posgrado, TecNM/Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Instituto Tecnológico No 2595. 63175, Col. Lagos del Country, Tepic, Nayarit, México.

³ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Altos, División de Ciencias Agropecuarias e Ingenierías, Rafael Casillas Aceves 1200, Tepatitlán de Morelos 47620, México.

⁴ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, Carretera Pachuca-Actopan, San Juan Tilcuautila, 42160 Pachuca, Hidalgo, México.

ABSTRACT

Nopalea cochenillifera (L.) Salm-Dyck is a scarcely studied cactus; its characterization contributes to identify the bioactive compounds it contains and its functional properties, which will allow the generation of information on potential uses and applications. The aim of this work was to physicochemically characterize *N. cochenillifera* cladodes flour and identify the phenolic compounds it contains. In general, *N. cochenillifera* flour is low in calories (337 kcal/100 g) with high total dietary fiber content (18.41%). In addition, it exhibits good water (11.04%) and oil (2.05%) absorption capacity, while swelling capacity was 25 mL/g DW. The soluble and hydrolyzable polyphenols content were 207.92 and 647.99 mg EAG/100 g DW, respectively. In addition, they showed antioxidant activity by DPPH[•] (15.28 mmol TE/g DW), FRAP (20.97 mmol TE/g DW), and ABTS^{•+} (51.31 mmol TE/g DW) methods. Furthermore, six phenolic acids (gallic, ferulic, chlorogenic, p-coumaric, syringic, and neochlorogenic) were identified by HPLC. According to the results, *N. cochenillifera* cladodes flour is an important source of fiber and bioactive compounds with interesting functional properties. In this context, *N. cochenillifera* flour could be used as an ingredient in the formulation of functional foods. However, further studies are needed on the shelf life and optimizing its preservation process, transformation, and functional potential.

Keywords: *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck, antioxidant capacity, dietary fiber, bioactive compounds, physicochemical characterization.

RESUMEN

Nopalea cochenillifera (L.) Salm-Dyck es un nopal poco estudiado, su caracterización contribuye a identificar los compuestos bioactivos y las propiedades funcionales que posee, esto permitirá, generar información sobre potenciales usos y aplicaciones. El objetivo del trabajo fue caracterizar

fisicoquímicamente la harina de cladodios de *N. cochenillifera* e identificar los compuestos bioactivos que contiene. En general, la harina de *N. cochenillifera* tiene bajas calorías (337 kcal/100 g) con alto contenido de fibra dietética (18.41%). Además, exhibe buena capacidad de absorción de agua (11.04%) y aceite (2.05%), mientras que la capacidad de hinchamiento fue de 25 mL/g base seca (bs). El contenido de fenoles solubles y polifenoles hidrolizables fueron 207.92 y 647.99 mg EAG/100 g bs respectivamente. Además, de presentar actividad antioxidante por DPPH[•] (15.28 mmol TE/g bs), FRAP (20.97 mmol TE/g bs) y ABTS^{•+} (51.31 mmol TE/g bs), se identificaron cinco ácidos fenólicos. De acuerdo con los resultados, la harina de *N. cochenillifera* es una fuente importante de fibra y compuestos bioactivos con propiedades funcionales. En este contexto, podría ser utilizada como ingrediente funcional en la formulación de otros alimentos. Sin embargo, son necesarios futuros estudios sobre la vida útil de la harina, así como la optimización de su proceso de conservación, transformación y potencial funcional.

Palabras clave: *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck, Capacidad antioxidante, fibra dietética, Compuestos bioactivos, Caracterización fisicoquímica

INTRODUCTION

Currently, there is a trend to consume foods that are low in carbohydrates but high in dietary fiber, as well as those containing functional ingredients. Fiber consumption has been associated with health benefits for modulating the intestinal microbiota. In addition, it regulates blood glucose and lipid (cholesterol and triglycerides) levels, contributing to the control and prevention of non-transmissible chronic diseases such as diabetes, dyslipidemias, and obesity (Holscher, 2017; Ríos-Hoyo *et al.*, 2017; Weickert and Pfeiffer, 2018).

In the literature, fresh nopal cactus is described as a vegetable with high water (88–95%) and carbohydrate (3–7

*Autor para correspondencia: Juan Pablo Hernández Uribe
 Correo electrónico: juan_hernandez8391@uaeh.edu.mx

g) content, low protein (0.5–1 g), lipid (0.2 g), and calorie (27 kcal/100 g) content (Sánchez-Tapia *et al.*, 2017; Stintzing and Carle, 2005; Inglese *et al.*, 2018). In addition, it contains bioactive compounds such as polyphenols, which have antioxidant activity. It has been reported that these compounds present in nopal decrease metabolic endotoxemia, glucose intolerance, lipogenesis and metabolic inflexibility (Sánchez-Tapia *et al.*, 2017). According to several authors, the nutritional composition and concentration of bioactive compounds in nopal cactus depends on environmental conditions, species, maturity stage, harvesting season, and/or post-harvest treatments (El-Mostafa *et al.*, 2014; Guevara-Figueroa *et al.*, 2010; Nuñez-López *et al.*, 2013). In Mexico, nopal cactus is consumed fresh (in salads) and the nopal flour is used with other ingredients in a variety of traditional culinary dishes including juices, snacks, and tortillas (Rodríguez-García *et al.*, 2007; Saenz, 2000). Furthermore, it has been used in traditional medicine due to its anti-inflammatory and antimicrobial properties, as well as hypoglycemic activity attributed to the presence of bioactive compounds and dietary fiber (Díaz *et al.*, 2017; NECCHI *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2005). Furthermore, over 125 nopal species have been identified in Mexico, where the most commercialized variety is *Opuntia*, while *N. cochenillifera* (L. Salm-Dyck) is one of the least exploited (Inglese *et al.*, 2018).

Native of Mexico, *N. cochenillifera* is endemically distributed across Central America. It can reach a height of 3–6 m and is widely adapted to extreme weather conditions, although its maturation takes longer in cold climates (Scheinvar, 2004). It is considered a wild species, mostly grown in gardens and backyards and used in landscaping, as forage, and/or hedgerows (Lim, 2012). Cladodes are edible, narrow (4–7 cm), and long (20–30 cm); they show a few spines on the bark as compared to other species (Beccaro *et al.*, 2015; Scheinvar, 2004). *N. cochenillifera*, grown all year round and commonly sold locally, and despite having commercial potential, it is undervalued since it is unknown in other markets, especially those far from the cultivation areas (Reyes-Agüero and Aguirre-Rivera, 2016). There is scarce information on the physicochemical and nutritional characterization of the species as well as that of its bioactive compounds and their potential uses. In addition, it has been reported that nopal flours have been used as a food supplement in the production of doughs and bakery products, in order to increase their functional properties (Ayadi *et al.*, 2009; Nabil *et al.*, 2020). Therefore, the objective of this work was to physicochemically characterize *N. cochenillifera* cladodes flour and identify the phenolic compounds that it contains.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

The cladodes from *N. cochenillifera* were manually and randomly harvested in the Valley region of Tulancingo, Hidalgo, Mexico. The cladodes were used at commercial maturity, considering the following morphometric variables: 25 cm length, 6 cm width, and 1 cm thickness.

Sample preparation

Three batch cladodes with spines were selected according to the provisions in the Codex Alimentarius (Codex, 2017). First, spines were removed manually, and cladodes were washed with distilled water and disinfected with a NaClO solution (4.5 mg/L). Next, cladodes were cut into strips (10 cm long, 1 cm wide), then dried at 45 °C for 48 h in a convection oven (3489M-1, Barnstead International, Dubuque, Iowa, US), ground in a mill (UDY Cyclone Sample Mill), and sieved through a 100-mesh screen (US). Finally, powder samples stored in airtight polyethylene bags at room temperature and darkness until analysis.

Proximal analysis

Moisture (method 934.06), total soluble solids (method 932.12), protein (method 978.04), ashes (method 940.26), and lipids (method 950.54) were quantified using the official methods in AOAC (2012). Total carbohydrates were calculated by difference (equation 1), while energetic value was estimated using the equation (2) proposed by Nabil *et al.* (2020).

$$\text{Total carbohydrates (g/100 g)} = 100 - (\text{lipids} + \text{ash} + \text{proteins}) \quad (1)$$

$$\text{Energy (Kcal/100 g)} = 4 * (\text{proteins} + \text{carbohydrates}) + 9 * (\text{lipids}) \quad (2)$$

Dietary fiber

Dietary fiber (DF) was assessed by the enzymatic-gravimetric method with modifications by Mañas and Saura-Calixto (1995). First, samples (0.5 g) mixed with 25 mL of phosphate buffer (0.08 M, pH 6) was heated at 100 °C for 5 min, and then treated with 25 µL of thermostable α-amylase (A-3306, Sigma Chemical Co., St Louis MO, US) at 100 °C/35 min, after that, samples were cooled at ambient temperature. Furthermore, the pH of the solution was adjusted at 7.5 with NaOH (1N); next, 50 µL of protease (Sigma Chemical Co., St Louis MO, US Sigma, P-5380 at 50 mg/mL of phosphate buffer) were added, and samples incubated in a water bath at 60 °C/35 min, and cooled at ambient temperature. The pH was adjusted at 4.5 with HCl (1N), and 150 µL of β-amyloglucosidase (Sigma Chemical Co., St Louis MO, US Sigma, A-9913) were added, and the solution was heated again at 60 °C/35 min. Finally, the solution was centrifuged using a high-speed centrifuge (BKC-TH21RL, Biobase, Shandong China) at 3000 x g, 25 °C, for 15 min, to separate the soluble and insoluble fractions. The supernatants collected from the centrifugation were dialyzed (D-9652, 33 mm, 12400 Da, Sigma Aldrich) against deionized water for 24 h. The supernatants were dialyzed against water to prevent the loss of soluble dietary fiber (SDF). The dialysates containing SDF (17 mL) were acid hydrolyzed (12 M H₂SO₄) and incubated in water bath at 100 °C for 90 min. The SDF content was calculated using the method proposed by Englyst and Cummings (1988), using 3,5 dinitrosalicylic acid and glucose as standard at 530 nm. On the other hand, residues (insoluble dietary fiber, IDF) previously oven-dried were subject to acid hydrolysis (3 mL of 12 M H₂SO₄ in a water bath at 37 °C for 1

h), followed by the addition of 33 mL of distilled water and kept in a water bath (100 °C for 90 min). Finally, the solution was centrifuged (6000 \times g, 25 °C, 15 min) and supernatant was recovered. The IDF content was quantified using DNS reagent at 530 nm, as previously described. The remaining residues of IDF were quantified as Klason lignin (KL) by gravimetric method. IDF was calculated as NSP plus KL, while the total dietary fiber content was the sum of SDF and IDF.

pH

The pH was assessed with a digital potentiometer (HI 2211 PH/MV, HANNA) calibrated before the measurement with reference buffer solutions (pH 4.0 and 7.0), according to AOAC (2012), based on the immersion of an electrode in the solution. The sample (1 g) was mixed in 10 mL distilled water for analysis, and the reading was recorded.

Color attributes

The color was quantified using a colorimeter (CR-410, Konica Minolta, Sensing Inc., Osaka, Japan) previously calibrated. Results were expressed according to the rectangular coordinate system $L^*a^*b^*$.

Apparent density

The apparent density was determined using the method reported by Kaur and Singh (2005). Density was calculated in a graduated cylinder previously tared with 10 mL of the sample, and the sample weight was calculated as grams per volume unit (g/mL).

Water solubility index and water absorption capacity

The water solubility index (WSI) and the water absorption capacity (WAC) analysis were performed following the methodology proposed by Anderson *et al.* (1969), with minor modifications. The sample (2.5 g) was homogenized with 30 mL distilled water, kept at 30 °C in a water bath for 30 min, and then centrifuged using a high-speed centrifuge (BKC-TH21RL, Biobase, Shandong China) at 3000 \times g/30 min. The supernatant was decanted and oven-dried (3489M-1, Barnstead International, Dubuque, Iowa, US) at 90 °C for 24 h. Additionally, the pellet weight was recorded, and WSI and WAC were calculated with equation 3 and 4, respectively. The results of WSI are expressed in percentage, and WAC as g of retained water per g dry weight.

$$WSI (\%) = \frac{\text{Weight of dry solids in supernatant}}{\text{Weight of dry sample}} * 100 \quad (3)$$

And

$$WAC = \frac{\text{Residue weight, which contained the water (g)}}{\text{Original weight of cladodes flour (g)}} \quad (4)$$

Oil absorption capacity

Oil absorption capacity (OAC) was assessed following the methodology by Anderson *et al.* (1969) with minor modifications. The sample (2.5 g) was mixed with 30 mL common corn oil in a 50-mL conical tube, shaken in a vortex for 1 min and then centrifuged using a high-speed centrifuge

(BKC-TH21RL, Biobase, Shandong China) at 3000 \times g/30 min, and the supernatant was decanted. The pellet weight was recorded, the OAC was calculated using the equation (5), and results expressed as g of oil retained per g of sample.

$$OAC = \frac{\text{residue weight, which contained the oil (g)}}{\text{Original weight of cladodes flour (g)}} \quad (5)$$

Swelling capacity

The swelling capacity (SC) was determined using the method described by Robertson *et al.* (2000). The sample (100 mg) was hydrated with 10 mL distilled water in a calibrated cylinder (1.5 cm diameter) at room temperature. Then, after equilibration (18 h), the volume occupied by sample was recorded and expressed as volume per g dry weight.

Total soluble polyphenols, hydrolyzable polyphenols, and condensed tannins quantification

According to the methodology by Pérez-Jiménez *et al.* (2008), an organic-aqueous extraction was performed to quantify the different compounds. The sample (0.5 g) was mixed with 20 mL methanol-acidified water solution (0.8 % HCl 72.8 g/L). The mixture was stirred at room temperature at a moderate speed (10 \times g for 1 h) in a shaker (Heidolph Rex 2, Heidolph Instruments, Schuwbach, Germany) and then centrifuged at 8000 \times g for 10 min at 4 °C. Next, the recovered supernatants and the residues were mixed with acetone-water solution (20 mL, 80:20 v/v), stirred for 1 h at room temperature and centrifuged under described conditions. Both supernatants were combined to measure soluble phenols (at 750 nm) by the Montreau (1972) procedure, using the Folin-Ciocalteu reagent, and the results expressed as milligrams of gallic acid equivalent per 100 g dry weight (mg EAG/100 g DW), with a standard curve of gallic acid. The residues of the extraction were used to quantify non-extractable polyphenols (NEP) made up of hydrolyzable polyphenols (HP) and condensed tannins (CT). The determination of HP was according to the method proposed by Hartzfeld *et al.* (2002). The residues obtained from the organic-aqueous extraction were hydrolyzed with 20 mL methanol/H₂SO₄ 90:10 (v/v) at 85 °C for 20 h, and then centrifuged using a high-speed centrifuge (BKC-TH21RL, Biobase, Shandong China) at 3000 \times g at 25 °C for 15 min, to assess HP in the supernatants using the Folin-Ciocalteu reagent as previously described. The CT were analyzed in the extraction residues, which were hydrolyzed with 10 mL butanol-HCl-FeCl₃ (100 °C, 3 h) and centrifuged using a high-speed centrifuge (BKC-TH21RL, Biobase, Shandong China) at 8000 \times g, for 10 min, to recover supernatants, and absorbance was measured at 555 nm, according to Reed *et al.* (1982). CT were calculated using a standard curve of proanthocyanidins from Mediterranean carob pods (*Ceratonia siliqua* L.), and the CT content expressed as mg/g DW. The quantification of total phenolic compounds was determined with the sum of soluble polyphenols (TSP) and hydrolyzable phenols. A multi-mode microplate reader (Synergy HT, Biotek Instruments Inc., Winooski, Vermont, US) was used to quantify soluble and hydrolyzable phenols.

Antioxidant activity

The antioxidant capacity of the organic aqueous extracts was quantifying 2,2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) radical cation scavenging activity, analyzed using a modified version of the methodology by Re *et al.* (1999). The radical cation was prepared by mixing 19.3 mg of ABTS⁺ (7 mM) in 5 mL of potassium persulfate (2.45 mM) and stored (12 - 16 h) in the dark at room temperature under magnetic stirring. The ABTS⁺ solution was adjusted with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) to an absorbance of 0.7 (\pm 0.02) at 734 nm. The Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as a standard and methanol as a blank. Sample (30 μ L) was mixed with 255 μ L ABTS⁺ (30 °C for 7 min). The reduction in absorbance was measured at 734 nm. The scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radicals was performed according to Prior *et al.* (2005) with some modifications. The Trolox sample or standard (30 μ L) reacted with 200 μ L DPPH[•] solution (190 μ M, using methanol as dissolvent) while absorbance was measured at 517 nm after 10 min. The ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) was carried out following the methods by Benzie and Strain (1996), with modifications. The FRAP solution, 10:1:1 (v/v/v) of sodium acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridyls-triazine), and 20 mM iron chloride hexahydrate, was tempered to 37 °C before mixing with the samples. The extract of the sample (24 μ L) or Trolox standard was added to a 96-well microplate, then mixed with 180 μ L FRAP solution using a multichannel dispenser, and the absorbance measured at 595 nm after 30 min. A multi-mode microplate reader (Synergy HT, Bio-Tek, Instrument Inc., Winooski, Vermont, US) was used to quantify the antioxidant activity of described methods. All the methods of antioxidant capacity and results were expressed as mmol Trolox equivalent per g dry weight (mmol TE/g DW).

Carotenoid content

The sample carotenoids were determined according to Ortega *et al.* (2013). Two g of sample were mixed with 7 mL of acetone:petroleum ether 80:20 (v/v) and 0.5 g of MgCO₃, then homogenized for 1 min before centrifuged using a high-speed centrifuge (BKC-TH21RL, Biobase, Shandong China) at 15000 rpm for 30 minutes at 4 °C. The supernatant was placed in a separator funnel adding 15 mL of NaCl (20%), the aqueous phase drained, and the organic layer diluted to 10 mL with petroleum ether. Absorbance was measured at 448 nm using a UV/Vis spectrophotometer (Jenway model 6705). The quantification was performed using a β -carotene calibration curve, and the results expressed as mg β -carotene per 100 g dry weight.

Quantification of phenolic acids by HPLC

The identification of phenolic acids was performed in an HPLC system (1260 Infinity, Agilent Technologies, Waldbron, Germany) equipped with photodiode-array detection and a C18 reversed phase column (particle size 5 μ m, diameter 4.6 mm, and length 250 mm, Thermo Scienti-

fic[®], Sunnyvale, California, US). The mobile phases were 2% acidified water with acetic acid (eluent A) and acidified water (0.5% acetic acid): methanol 10:90 (eluent B). The standards and extracts of the sample were analyzed using a 0% B gradient; 0–35 min, 35% B; 35–55 min, 75% B; 55–60 min, 100% B; and 60–70 min, 0% B, at a flow rate of 0.4 mL/min. The peak areas were detected at 280 and 320 nm for the sample and calibration curve (0.5–300 μ g/mL) of gallic, ferulic, chlorogenic, p-coumaric, syringic, and neochlorogenic acids (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Missouri, US), were used to identify and quantify the polyphenolic compounds (Jiménez *et al.*, 2014).

Statistical analysis

All results were expressed as mean values \pm standard deviation. Data were analyzed using Sigma-Stat version 11. All the analytical measurements were done in triplicate on a same batch of nopal flour, nine determinations were made.

RESULTS AND DISCUSSION

Proximal analysis

Table 1 shows the nutritional composition of the *N. cochenillifera* flour. The moisture content (4.6%) is adequate for storage, which reduces the enzymatic reactions and/or presence of microorganisms (Rodríguez-García *et al.*, 2007). Moreover, the lipid (1.20%) and protein (6.44%) contents were lower than those reported in *Opuntia ficus-indica* flour (lipid 2.3% and protein 8.76%), while the total carbohydrates (75.16%) and ashes (17.2%) in *N. cochenillifera* were higher than those reported (Nabil *et al.*, 2020) in *Opuntia ficus-indica* (74.27% carbohydrates and 11.90% ashes respectively). Additionally, the caloric contribution of cladodes flour was of 337 kcal/100 g, while higher values has been reported for commercial flours from corn and wheat (397.68 kcal/100 g and 384.2 kcal/100 g, respectively) (Kavitha and Parimalavalli, 2014).

The consumption of dietary fiber associates to beneficial effects on consumers' health (Holscher, 2017).

Table 1. Nutritional composition of *N. cochenillifera* cladodes flour.

Tabla 1. Composición nutricional de la harina de cladodios de *N. cochenillifera*.

| Parameter | Cladodes flour |
|--|------------------|
| Moisture (g/100 g dry weight) | 4.6 \pm 0.06 |
| Protein (g/100 g dry weight) | 6.44 \pm 0.82 |
| Lipid (g/100 g dry weight) | 1.20 \pm 0.04 |
| Carbohydrate (g/100 g dry weight) | 75.16 \pm 0.97 |
| Ash (g/100 g dry weight) | 17.2 \pm 0.11 |
| Energy (Kcal/100 g dry weight) | 337.2 \pm 1.83 |
| Total dietary fiber (g/100 g dry weight) | 18.41 \pm 0.05 |
| Insoluble dietary fiber (g/100 g dry weight) | 16.92 \pm 0.19 |
| Soluble dietary fiber (g/100 g dry weight) | 1.49 \pm 0.21 |

All values are means \pm standard deviation of three determinations per batch.

The total dietary fiber content in *N. cochenillifera* flour was 18.41% (16.92% insoluble and 1.49% soluble), similar to that reported by Stintzing and Carle (2005), who found the average content of fiber in dehydrated *Opuntia* was 18%. Additionally, reports show that the amount of soluble fiber decreases as cladode ages, while insoluble fiber increases (Nabil et al., 2020; Rodríguez-García et al., 2007). The low soluble fiber content in *N. cochenillifera* may associate to the drying temperature (45 °C) during cladodes flour processing, which is the same as that of the glass transition of mucilage, promoting soft-flexible to rigid state and solubility changes, leading to possible hydrolysis (Ventura-Aguilar et al., 2017). According to the World Health Organization, the recommended fiber dietary intake (RDI) is an average of 25 g/day for both men and women; therefore, adding 15 g of *N. cochenillifera* flour to food products could contribute to at least 10% of the RDI. Subsequently, *N. cochenillifera* flour is a potential source of dietary fiber and its consumption could prevent and control non-transmissible chronic diseases (Bchir et al., 2014). Furthermore, previous reports show that both soluble and insoluble nopal fiber has therapeutic effect on irritable bowel syndrome when nopal when consumed at a 20 g/day dose (Remes-Troche et al., 2021). In this context, it is feasible the use *N. cochenillifera* flour as a functional ingredient in products with low caloric and high dietary fiber contents.

Physicochemical properties

Table 2 shows pH, total soluble solids, and color attributes of cladodes flour that showed a pH of 5.1, consistent with pH reported by Sáenz and Berger (2006), who found pH values from 4.0 to 7.0 in *Opuntia* flours. The total soluble solids in the flour were 6.9 °Brix, possibly associated with *N. cochenillifera* soluble sugar (glucose) content (Nabil et al., 2020). On the other hand, the color parameters if luminosity (*L), reddening (a), and yellowing (b) of cladodes flour were 67.62, -3.47, and 18.2, respectively, indicating that the flour exhibited a yellow, pale green color, similar to that reported in *O. ficus-indica* powder (Sáenz et al., 2010). The *N. cochenillifera* cladodes flour apparent density was 0.6 g/mL, similar to the reports on spineless *O. ficus indica f. inermis* cladodes powders (Ayadi et al., 2009). This parameter relates to dietary fiber content; insoluble fiber content (mostly insoluble cellulose and hemicellulose) or soluble fiber fraction (mainly mucilages and pectins), which could modify powder density (Nuñez-López et al., 2013).

Functional properties

The WSI relates to the presence of soluble molecules in the flour. The cladodes flour WSI was 5.4; powdered spineless cladodes have shown a higher WSI as compared against spine-covered cladodes (Ayadi et al., 2009). The WAC is a property linked to water retention within a matrix, which largely depends on the physicochemical nature of the flour fiber fraction; it directly affects the technological and functional properties of the flour. The cladodes flour WAC value was 11.4 g of water/g DW, which relates to the water retention

Table 2. Physicochemical parameters and functional properties of *N. cochenillifera* cladodes flour.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos y propiedades funcionales de la harina de cladodios de *N. cochenillifera*.

| Parameter | Cladodes flour |
|--|----------------|
| pH value | 5.1 ± 0.06 |
| Total soluble solids (°Bx) | 6.9 ± 0.02 |
| L* | 67.62 ± 0.01 |
| a* | -3.47 ± 0.02 |
| b* | 18.20 ± 0.01 |
| Bulk density (g/ml) | 0.6 ± 0.0 |
| Water solubility index (%) | 5.4 ± 0.85 |
| Water absorption capacity (g water/g dry weight) | 11.4 ± 0.03 |
| Oil absorption capacity (g of oil/g dry weight) | 2.05 ± 0.05 |
| Swelling capacity (mL/g dry weight) | 25.0 ± 0.02 |

All values are means ± standard deviation of three determinations per batch.

capacity due to hydrophilic components in its matrix. *N. cochenillifera* showed a higher WAC value (11.4 g of water/g DW) than that reported in *Opuntia* (8 g of water/g DW) (Ayadi et al., 2009; Nuñez-López et al., 2013). Furthermore, its WAC was higher than those reported for flours made from apples, pears, and carrots; which showed WAC ranging from 1 to 8 g of water/g DW (Ahmad et al., 2016).

On the other hand, the OAC is a relevant parameter to evaluate the hydrophobic nature of the particles that constitute the fiber fraction in the flour (Ventura-Aguilar et al., 2017). *N. cochenillifera* powder showed an OAC of 2.05 g of oil/g DW, comparable to the same OAC value in flours obtained from vegetable sources such as apple and pear (Bchir et al., 2014).

In addition, the SC relates to the dietary fiber content since carbohydrates interact with free polar groups through hydrophilic bonds, retaining them in a matrix. Cladodes flour showed an SC of 25 mL/g DW, which suggests that its components can absorb water due to its capacity to form matrices similar to those of a gel. In addition, these properties promote a low diffusion and a higher absorption of lipid compounds or sugars (Nuñez-López et al., 2013).

These characteristics directly affect the cladodes flour technological and functional properties. They could induce beneficial effects in health by significantly increase chyme viscosity in a dose- or amount-dependent manner. This fact leads to a beneficial regularity by altering fecal viscosity since this property determines the speed at which a substrate transits through the large intestine (McRorie Jr and McKeown, 2017).

Biocompound contents and antioxidant capacity

Table 3 shows the soluble and hydrolyzable polyphenols, tannins, carotenes, and antioxidant activity. The *N. cochenillifera* flour total phenol content was 207.95 mg GAE/100 g DW, slightly higher than the 180 mg GAE/100 g

Table 3. Bioactive compounds content and antioxidant activity of *N. cochenillifera* cladodes flour**Tabla 3.** Contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de la harina de cladodios de *N. cochenillifera*.

| Parameter | Cladodes flour |
|--|----------------|
| Total soluble phenols (mg GAE/100 g DW) | 207.92 ± 0.74 |
| Hydrolysable polyphenols (mg GAE/100 g DW) | 647.99 ± 3.18 |
| Condensed tannins (mg/g DW) | 3.55 ± 0.4 |
| Carotenes (mg β-carotene/100 g DW) | 4.36 ± 0.2 |
| Antioxidant activity | |
| DPPH [•] (mmol TE/g DW) | 15.28 ± 0.4 |
| FRAP (mmol TE/g DW) | 20.97 ± 0.5 |
| ABTS ^{•+} (mmol TE/g DW) | 51.31 ± 4.71 |

All values are means ± standard deviation of three determinations per batch. TE = Trolox equivalent, FRAP = Ferric-reducing antioxidant power assay, DPPH[•] = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay, ABTS^{•+} = 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid assay, DW = Dry weight, GAE = Gallic acid equivalent.

DW reported by Gallegos-Infante *et al.* (2009) in *O. ficus-indica* cladodes flour. The difference between these values may relate to the drying process, since previous work showed that different airflow rates and temperatures, modify total phenols (Medina-Torres *et al.*, 2011). The content of hydrolyzable polyphenols in *N. cochenillifera* flour was 647.99 mg GAE/100 g DW. The hydrolyzable forms include a larger proportion of the polyphenols present in *N. cochenillifera* flour than the soluble polyphenols, as previously shown.

On the other hand, tannins are high-molecular-weight polyphenols beneficial to health. Their monomer structure classifies them into two groups: hydrolysable tannins formed by phenolic acids and condensed tannins (Chung *et al.*, 1998). The latter showed values of 3.55 mg/g DW in *N. cochenillifera*, which depends on the maturity of the cladodes (Figueroa-Pérez *et al.*, 2018). Another activity evaluated in Carotenes, is their antioxidant activity, since they are very efficient physical quenchers of singlet oxygen and scavengers of other reactive oxygen species (Fiedor and Burda, 2014). The *N. cochenillifera* cladodes flour carotene content (4.36 mg β-carotene/100 g DW) was higher than that reported for *Opuntia* cladodes (3.79 mg/100 g DW) subjected to heat treatments. There are reports showing that the extraction of nopal carotenes depends on the presence of mucilage, since these compounds can form complexes with pectin, thus the use of high temperatures for their extraction are necessary (Sáenz *et al.*, 2010, Saenz, 2006; Jaramillo-Flores *et al.*, 2003).

The *N. cochenillifera* cladodes flour antioxidant activity, assessed with DPPH[•], FRAP, and ABTS^{•+}, was 15.28, 20.97, and 51.31 mmol TE/g DW, respectively. The highest antioxidant activity value may relate to the *N. cochenillifera* cladodes flour high polyphenols content. In contrast, the low tannins and carotenes content may influence the lowest value, reported previously, showing that polyphenols significantly correlate with ABTS^{•+} assays, while tannins with DPPH[•] assays (Figueroa-Pérez *et al.*, 2018). Additionally, the antioxidant capacity

shown with FRAP could be mainly due to the tannins and carotenes content, since these compounds are very efficient at controlling singlet oxygen, and phenolic compounds can sequester free radicals and electron transfer (ABTS^{•+}) better (Koracevic *et al.*, 2001; Pertuzatti *et al.*, 2014).

Polyphenol profile

The *N. cochenillifera* cladodes flour phenolic compounds (gallic, ferulic, chlorogenic, p-coumaric, syringic, and neochlorogenic) content detected by HPLC, are shown in Table 4 and Figure 1. According to soluble polyphenols chromatographic profile, multiple unidentified peaks are shown, which could correspond to phenolic compounds that have been reported by Figueroa-Pérez *et al.* (2018), who identified 15 phenolic acids compounds in nopal cladodes at different maturity stages, from which only 11 were previously identified in commercial and wild *Opuntia* spp. (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010). Considering the diversity of phenolic compounds reported in other nopal varieties, the unidentified peaks in the *N. cochenillifera* phenolic profile, may include salicylic, protocatechuic, 4-Hydroxybenzoic, vanillic, caffeic, synaptic, eucomic and chlorogenic acids (Astello-García *et al.*, 2015; Figueroa-Pérez *et al.*, 2018; Guevara-Figueroa *et al.*, 2010; Kolniak-Ostek *et al.*, 2020; Mata *et al.*, 2016; Missaoui *et al.*, 2020). Therefore, further studies are necessary to identify *N. cochenillifera* phenolic compounds.

On the other hand, the most abundant phytochemicals identified were gallic, ferulic and chlorogenic acids. The gallic acid content (2708.49 µg/g) indicated in this study was higher than that found by Jun *et al.* (2013). However, the same author reported that ferulic, chlorogenic and p-coumaric acid contents were higher than the data obtained in this study (796.73, 179.70 and 80.58 µg / g, respectively). This difference in the phenolic acid content is likely due to factors such as the cladodes maturity stage, species, geographic conditions, and other environmental conditions (Moussa-Ayoub *et al.*, 2014).

Figueroa-Pérez *et al.* (2018) observed different polyphenol profiles in nopal (*O. ficus-indica*) cladodes collected at different maturity stages, with association to health beneficial effects. For example, chlorogenic acid relates with

Table 4. Soluble polyphenol content of *N. cochenillifera* cladodes flour.**Tabla 4.** Contenido de polifenoles solubles de la harina de cladodios de *N. cochenillifera*.

| No. | Compound | Retention time. (min) | Cladodes flour Content (µg/g) |
|-----|---------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 1 | Gallic acid | 15.65 | 2708.49 ± 106.59 |
| 2 | Ferulic acid | 53.71 | 796.73 ± 1.43 |
| 3 | Chlorogenic acid | 36.85 | 179.70 ± 12.51 |
| 4 | Coumaric acid | 50.05 | 80.58 ± 12.13 |
| 5 | Syringic acid | 41.52 | 11.12 ± 0.56 |
| 6 | Neochlorogenic acid | 21.21 | 9.52 ± 0.28 |

All values are means ± standard deviation of three determinations per batch.

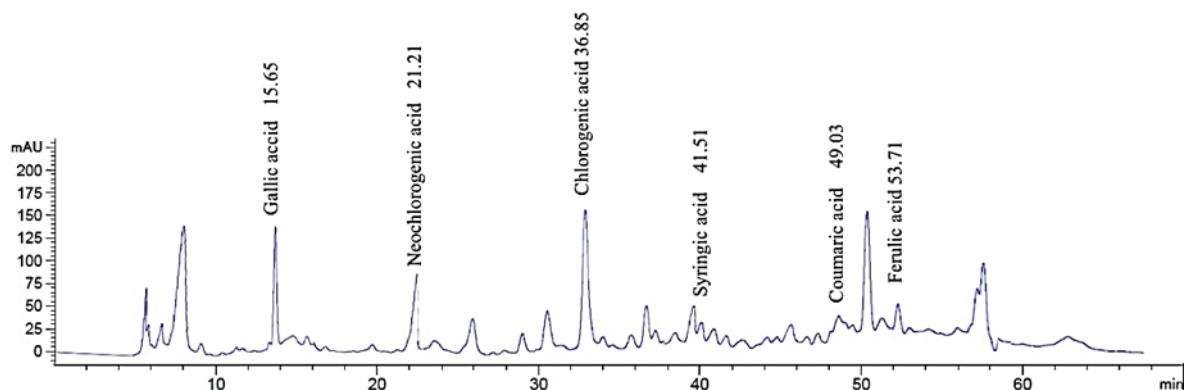


Figure 1. Soluble polyphenols chromatographic profile of *N. cochenillifera* cladodes flour.

Figura 1. Perfil cromatográfico de polifenoles solubles de la harina de cladodios de *N. cochenillifera*.

antidiabetic effects by delaying intestinal glucose absorption and inhibiting hepatic gluconeogenesis, while gallic acid has shown beneficial effects in the prevention and/or management of various disorders, attributed to its antioxidant potential (Kahkeshani *et al.*, 2019; Ong *et al.*, 2012). These results suggest that *N. cochenillifera* cladodes flour may provide antioxidant properties and offer effective protection from free radicals, and support that *N. cochenillifera* could be a promising source of natural antioxidants.

CONCLUSION

The results demonstrated that *N. cochenillifera* has similar properties to the *Opuntia ficus-indica* nopal, and bioactive compounds with antioxidant activity beneficial to the consumers' health. This study is the first step to give an added value to and promote the consumption of this nopal cactus species, which is undervalued in the markets. Furthermore, the cladodes flour phytochemical content and antioxidant activity, makes it a candidate as a functional ingredient in the elaboration of widely used products, such as tortillas and snacks. On the other hand, future studies on the shelf life, optimization, and conservation of cladodes flour are necessary.

ACKNOWLEDGMENTS

One of the authors (HEFI) acknowledges CONACYT-Mexico for the scholarship awarded to study the Master in Food Science at the "Instituto de Ciencias de Agropecuarias" (ICAP-UAEH).

CONFLICTS OF INTEREST.

The authors declare that no conflict of interest exists related with this publication.

REFERENCES

- Ahmad, M., Wani, T. A., Wani, S. M., Masoodi, F. A. and Gani, A. 2016. Incorporation of carrot pomace powder in wheat flour: effect on flour, dough and cookie characteristics. *Journal of Food Science and Technology*. 53: 3715-3724.

- Anderson, R., Conway, H., Pfeifer, V. and Griffin, E. 1969. Roll and extrusion-cooking of grain sorghum grits. *Cereal Science Today*. 14: 372-376.
- AOAC 2012. Official Methods of Analysis, Methods 925.10; 920.87; 920.85 and 923.03, Gaithersburg, MD, U.S.A., AOAC International.
- Astello-García, M. G., Cervantes, I., Nair, V., Santos-Díaz, M. D. S., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., Cisneros-Zevallos, L. and Barba De La Rosa, A. P. 2015. Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*. 43: 119-130.
- Ayadi, M., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M. and Attia, H. 2009. Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops and Products*. 30: 40-47.
- Bchir, B., Rabetafika, H. N., Paquot, M. and Blecker, C. 2014. Effect of pear, apple and date fibres from cooked fruit by-products on dough performance and bread quality. *Food and Bioprocess Technology*. 7: 1114-1127.
- Beccaro, G. L., Bonvegna, L., Donno, D., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., Nieddu, G., Chessa, I. and Bounous, G. 2015. *Opuntia* spp. biodiversity conservation and utilization on the Cape Verde Islands. *Genetic resources and crop evolution*. 62: 21-33.
- Benzie, I. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 239: 70-76.
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W. and Lin, Y. 1998. Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 38: 421-64.
- Codex, A. 2017. Codex Standard for Nopal Codex Stan 185-1993. In: Organization, F. A. A. O. T. U. N. W. H. (ed.) *Tropical Fresh Fruits and Vegetables*. first ed. Rome, Italy
- Díaz, M. D. S. S., De La Rosa, A.-P. B., Héliès-Toussaint, C., Guéraud, F. and Nègre-Salvayre, A. 2017. *Opuntia* spp.: characterization and benefits in chronic diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017:8634249.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbjaj, M., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B. and Cherkaoui-Malki, M. 2014. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*. 19: 14879-14901.

- Englyst, H. N. and Cummings, J. H. 1988. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 71: 808-814.
- Fiedor, J. and Burda, K. 2014. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 6: 466-488.
- Figuroa-Perez, M. G., Perez-Ramirez, I. F., Paredes-Lopez, O., Mondragon-Jacobo, C. and Reynoso-Camacho, R. 2018. Phytochemical composition and in vitro analysis of nopal (*O. ficus-indica*) cladodes at different stages of maturity. *International Journal of Food Properties*. 21: 1728-1742.
- Gallegos-Infante, J.-A., Rocha-Guzman, N.-E., González-Laredo, R.-F., Reynoso-Camacho, R., Medina-Torres, L. and Cervantes-Cardozo, V. 2009. Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes (*Opuntia ficus indica*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60: 80-87.
- Guevara-Figueroa, T., Jimenez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L.-W., De Leon-Rodriguez, A., Fomsgaard, I. S. and De La Rosa, A. P. B. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 23: 525-532.
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D. and Hagerman, A. E. 2002. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1785-1790.
- Holscher, H. D. 2017. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes*. 8: 172-184.
- Inglese, P., Mondragon, C., Nefzaoui, A., Saenz, C., Taguchi, M., Makkar, H. and Louhaichi, Mounir 7/10/2018. Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal, Rome Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Jaramillo-Flores, M. E., Gonzalez-Cruz, L., Cornejo-Mazon, M., Dorantes-Alvarez, L., Gutierrez-López, G. F. and Hernandez-Sanchez, H. 2003. Effect of Thermal Treatment on the Antioxidant Activity and Content of Carotenoids and Phenolic Compounds of Cactus Pear Cladodes (*Opuntia ficus-indica*). 9: 271-278.
- Jiménez, V. M., Gruschwitz, M., Schweiggert, R. M., Carle, R. and Esquivel, P. 2014. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International*. 65: 42-46.
- Jun, H.-I., Cha, M.-N., Yang, E.-I., Choi, D. G. and Kim, Y.-S. 2013. Physicochemical properties and antioxidant activity of Korean cactus (*Opuntia humifusa*) cladodes. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 54: 288-295.
- Kakhshani, N., Farzaei, F., Fotouhi, M., Alavi, S. S., Bahramsoltani, R., Naseri, R., Momtaz, S., Abbasabadi, Z., Rahimi, R., Farzaei, M. H. and Bishayee, A. 2019. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iran J Basic Med Sci*. 22: 225-237.
- Kaur, M. and Singh, N. 2005. Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food chemistry*. 91: 403-411.
- Kavitha, S. and Parimalavalli, R. 2014. Effect of processing methods on proximate composition of cereal and legume flours. *Journal of Human Nutrition and Food Science*. 2: 1051.
- Kolniak-Ostek, J., Kita, A., Miedzińska, J., Andreu-Coll, L., Legua, P. and Hernandez, F. 2020. Characterization of Bioactive Compounds of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Seeds from Spanish Cultivars. 25: 5734.
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. and Cosic, V. 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of clinical pathology*. 54: 356-361.
- Lim, T. K. 2012. *Edible medicinal and non-medicinal plants*, Springer.
- Mañas, E. and Saura-Calixto, F. 1995. Dietary fibre analysis: methodological error sources. *European journal of clinical nutrition*. 49: S158-S162.
- Mata, A., Ferreira, J. P., Semedo, C., Serra, T., Duarte, C. M. M. and Bronze, M. R. 2016. Contribution to the characterization of *Opuntia* spp. juices by LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*. 210: 558-565.
- Mcorrie Jr, J. W. and Mckeown, N. M. 2017. Understanding the physics of functional fibers in the gastrointestinal tract: an evidence-based approach to resolving enduring misconceptions about insoluble and soluble fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 117: 251-264.
- Medina-Torres, L., Vernon-Carter, E. J., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzman, N. E., Herrera-Valencia, E. E., Calderas, F. and Jimenez-Alvarado, R. 2011. Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 1001-1005.
- Missaoui, M., D'antuono, I., D'imperio, M., Linsalata, V., Boukhchina, S., Logrieco, A. F. and Cardinali, A. 2020. Characterization of Micronutrients, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Prickly Pear Cladodes as Functional Ingredient. 25: 2176.
- Montreau, F. 1972. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *OENO One*. 6: 397-404.
- Moussa-Ayoub, T. E., Abd El-Hady, E.-S. A., Omran, H. T., El-Samahy, S. K., Kroh, L. W. and Rohn, S. 2014. Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus *Opuntia ficus-indica*. *Food Research International*. 64: 864-872.
- Nabil, B., Ouabou, R., Ouhammou, M., Essaadouni, L. and Mahrouz, M. 2020. Functional Properties, Antioxidant Activity, and Organoleptic Quality of Novel Biscuit Produced by Moroccan Cladode Flour "*Opuntia ficus-indica*". *Journal of Food Quality*. 2020: 3542398.
- Necchi, R. M., Alves, I. A., Alves, S. H. and Manfron, M. P. 2012. In vitro antimicrobial activity, total polyphenols and flavonoids contents of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae). *Research in Pharmacy*. 2(3): 01-07.
- Núñez-Lopez, M. A., Paredes-Lopez, O. and Reynoso-Camacho, R. 2013. Functional and hypoglycemic properties of nopal cladodes (*O. ficus-indica*) at different maturity stages using in vitro and in vivo tests. *Journal of agricultural and food chemistry*. 61: 10981-10986.
- Ong, K. W., Hsu, A. and Tan, B. K. 2012. Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: a contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. *PLoS One*. 7: e32718.

- Ortega, V. G., Ramírez, J. A., Velázquez, G., Tovar, B., Mata, M. and Montalvo, E. 2013. Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant content of 'Ataulfo' mango during postharvest maturation. *Food Science and Technology*. 33: 561-568.
- Perez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I. and Saura-Calixto, F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*. 41: 274-285.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rodrigues, D., Da Cruz, P. N., Hermosín-Gutiérrez, I., Smith, R. and Godoy, H. T. 2014. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. *Food Chemistry*. 164: 81-88.
- Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53: 4290-4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 26: 1231-1237.
- Reed, J. D., Mcdowell, R. T., Van Soest, P. J. and Horvath, P. R. 1982. Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 33: 213-220.
- Remes-Troche, J. M., Taboada-Liceaga, H., Gill, S., Amieva-Balmori, M., Rossi, M., Hernández-Ramírez, G., García-Mazcorro, J. F. and Whelan, K. 2021. Nopal fiber (*Opuntia ficus-indica*) improves symptoms in irritable bowel syndrome in the short term: a randomized controlled trial. *Neurogastroenterol Motil*. 33: e13986.
- Reyes-Agüero, J. A. and Aguirre-Rivera, J. R. 2016. Description of the fruit of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck sold in the traditional market of Rioverde, San Luis Potosí, Mexico. *Haseltonia*. 2016: 43-45.
- Rios-Hoyo, A., Romo-Araiza, A., Meneses-Mayo, M. and Gutiérrez-Salmeán, G. 2017. Prehispanic functional foods and nutraceuticals in the treatment of dyslipidemia associated to cardiovascular disease: A mini-review. *International journal for vitamin and nutrition research*. 87: 58-98.
- Robertson, J. A., De Monredon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R. and Thibault, J.-F. 2000. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. *LWT-Food Science and Technology*. 33: 72-79.
- Rodriguez-Garcia, M., De Lira, C., Hernandez-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M., Palacios-Fonseca, A., Rojas-Molina, I., Reynoso, R., Quintero, L., Del-Real, A. and Zepeda, T. 2007. Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods for Human Nutrition*. 62: 107-112.
- Saenz, C. 2000. Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits and cladodes. *Journal of Arid Environments*. 46: 209-225.
- Saenz, C. 2006. *Opuntia* spp. Bioactive compounds in foods: a plus for health. *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, Leuven, Belgium, 231-240.
- Saenz, C. and Berger, H. 2006. Utilización agroindustrial del nopal, *Food & Agriculture Org*.
- Saenz, C., Sepúlveda, E., Pak, N. and Lecaros, M. 2010. Chemical and physical characterization of cactus cladode (*Opuntia ficus-indica*) powder. *Italian Journal of Food Science*. 22: 416.
- Sanchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Pérez-Cruz, C., Pichardo-Ontiveros, E., Wang, M., Donovan, S. M., Tovar, A. R. and Torres, N. 2017. Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet. *Scientific reports*. 7: 1-16.
- Scheinvar, L. 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro: diversidad y riqueza.
- Stintzing, F. C. and Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular nutrition & food research*. 49: 175-194.
- Ventura-Aguilar, R. I., Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S. and Rivera-Cabrera, F. 2017. Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97: 5065-5073.
- Weickert, M. O. and Pfeiffer, A. F. 2018. Impact of dietary fiber consumption on insulin resistance and the prevention of type 2 diabetes. *The Journal of nutrition*. 148: 7-12.
- Young, J. E., Zhao, X., Carey, E. E., Welti, R., Yang, S. S. and Wang, W. 2005. Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49: 1136-1142.

In vitro cytotoxic activity of bark extracts from *Pinus durangensis* Martinez and *Quercus sideroxylla* Bonpl.

Actividad citotóxica in vitro de los extractos de *Pinus durangensis* Martinez y *Quercus sideroxylla* Bonpl.

Marcela Soto-García¹, Martha Rosales-Castro², José Rubén García-Sánchez³, María José Rivas-Arreola^{*4}

¹ Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas-DMCU, C.P.32310. Ciudad Juárez, Chih., México.

² Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR- Unidad Durango, Sigma 119 Fraccionamiento 20 de noviembre, C.P. 34220, Durango, Dgo. México.

³ Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Escuela Superior de Medicina del, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casto de Santo Tomas, Delegación Miguel Hidalgo, C.P. 113340, Ciudad de México, México.

⁴ Universidad Iberoamericana Puebla Blvd. del Niño Poblano 2901 Col. Reserva Territorial Atlixcáyolt San Andrés Cholula, Puebla, México C.P. 72820.

ABSTRACT

Nowadays, plants bioactive compounds represent a great potential for discovering novel drugs that could act in cancer treatment. Previous word reports that different pine and oak species possess cytotoxic activities against various cancer cell lines. The present study evaluated the phenolic profile and cytotoxic activities of crude and organic extracts from *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* bark. Among ESI-MS identified compounds in extracts from both species, are taxifolin and procyanidin dimers. The cytotoxic activity was performed on MDA-MB-231 (breast cancer), HeLa (cervix cancer), MCF-10A (breast non-tumorous cell), and HSF-1184 (human skin fibroblast cells) by MTT assay. All extracts showed a dose-dependent cytotoxic effect against cancer cell lines and small or no activity against the non-tumorous cells. The results provide important information about the cytotoxic activity of bark extracts from *P. durangensis* and *Q. sideroxylla*. This strong cytotoxic effect represents an opportunity for the valorization of a by-product of the wood industry.

Keywords: Bark extracts, cytotoxicity, phenolic profile.

RESUMEN

En la actualidad, los compuestos bioactivos de las plantas representan un gran potencial para descubrir un fármaco novedoso que pueda actuar en el tratamiento del cáncer. Se ha informado que diferentes especies de pino y roble poseen actividades citotóxicas contra varias líneas celulares cancerosas. En el presente estudio, se evaluó el perfil fenólico y las actividades citotóxicas de extractos crudos y orgánicos de la corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*. Algunos compuestos, como la taxifolina y dimeros de procianidina, fueron identificados en extractos de ambas especies mediante ESI-MS. La actividad citotóxica se realizó en MDA-MB-231 (cáncer de mama), HeLa (cáncer de cuello uterino), MCF-10A (células no tumorales de mama) y HSF-1184 (células de fibroblastos de piel humana) mediante ensayo MTT. Todos los extractos mostraron un efecto citotóxico dependiente de la dosis contra las líneas celulares cancerosas y poca o ninguna actividad contra las no tumorales. Los resultados proporcionan infor-

mación importante sobre la actividad citotóxica de extractos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*. Este fuerte efecto citotóxico representa una oportunidad para la valorización de un subproducto de la industria de la madera.

Palabras clave: Extractos de corteza, citotoxicidad, perfil fenólico

INTRODUCTION

Breast and cervix cancer are the most common cancer-related death cause among females worldwide. Thus, it is crucial to search for newer therapies that can help prevent and treat this illness, besides lessening the side effects of available therapies (Khosropanah *et al.*, 2016; Saenglee *et al.*, 2016). The use of medicinal plants in the treatment of diseases is increasing due to the benefits against chronic diseases like cancer, since plants have bioactive compounds, playing a vital role in the development of pharmaceuticals (Abdulla *et al.*, 2014).

The therapeutic potential of medicinal plants generally associates to the antioxidant activity of phytochemicals, mainly phenols and flavonoids, closely linked to their ability to suppress cancer cells' growth through reduced oxidative stress (Marvibaigi *et al.*, 2016). However, the cellular mechanisms by which the phenols elicit these anticancer effects are multifaceted (Sorice *et al.*, 2016).

Q. sideroxylla and *P. durangensis* are forest timber species in Mexico. Their primary non-timber uses are for edible harvesting seeds and even as medicine in the treatment of disorders like ulcers and inflammatory problems (Bermejo and Pontones 1999; Luna *et al.*, 2003). Previous studies reported antibacterial effects, high phenolic content, and antioxidant properties in *P. durangensis* extracts (Rosales-Castro and González-Laredo, 2003; Rosales-Castro *et al.*, 2006). Extracts from *Q. sideroxylla* have shown hypoglycemic and genotoxic effects, amelioration of oxidative stress evaluated in a murine model, high antioxidant capacity, anti-inflammatory effects, and anticarcinogenic activity in rat colon (Moreno-Jimenez *et al.*, 2015; Soto-García *et al.*, 2016). The main bioactive compound of these species identified is flavan-3-ols in *Q. sideroxylla* (Rosales *et al.*, 2012), and flavonoids like taxifolin

*Autor para correspondencia: María José Rivas Arreola
 Correo electrónico: mariajose.rivas@iberopuebla.mx

Recibido: 14 de junio de 2021

Aceptado: 26 de octubre de 2021

and quercetin in *P. durangensis* (Soto-García and Rosales-Castro, 2016).

Many investigations reported catechin, taxifolin, and quercetin as compounds with cytotoxic activities (Moreira *et al.*, 2013; Evacuasiyany *et al.*, 2014; Moreno-Jimenez *et al.*, 2015; Alzaharna *et al.*, 2017; Rameshthangam and Chitra, 2017). Thus, this research aimed to determine the cytotoxic activities of polyphenolic extracts from *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* bark against MDA MB-231, MCF 10A HeLa, and HSF-1184 cell lines.

METHODS

Plant material

The bark collection was in January 2014 in Pueblo Nuevo, Durango, México. María Del Socorro Gonzalez Elizondo (taxonomist) identified the samples, and botanical specimens deposited at the Herbarium in CIIDIR-IPN, Durango, with vouchers number 42842, 428443, 42844 for *Q. sideroxylla* and 93, 97, 99, 100, 101 for *P. durangensis*. The bark preparation consisted in a mixture to make a unique sample, drying at room temperature, milled (mesh 40), and finally stored at 4 °C in paper bags until further use.

Extracts preparation and purification

The bark powder (10 g) was twice soaked with 50% ethanol (ethanol/water 50:50 v/v) (2 x 300 mL) with stirring at room temperature for 24 h, then filtered through a Whatman filter paper no. 1. The extracts were combined, filtered, and then vacuum evaporated at 40 °C until ethanol was removed. A portion of the remaining aqueous extract was dried and identified as crude extract (CE); the other portion went through a liquid partition process with ethyl acetate (3 x 100 mL). The organic phase was vacuum evaporated at 40 °C and identified as the organic extract (OE).

ESI-MS analysis

To obtain the *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* OE spectra, we used a micrOTOF-QII mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source (ESI). The parameters were set as capillary 2700 V, nebulizer pressure 1.2 bar, dry gas flow 11 L/min, and dry gas temperature 200 °C and the sample ran in the negative ion mode. The scan range was from 50 to 3000 m/z.

Cytotoxic evaluation

Cell lines and culture conditions

Human breast cancer (MDA-MB-231), human cervical cancer (HeLa), and non-cancer (MCF-10A and H-1184) cell lines were from the American Tissue Culture Collection (ATCC, USA). The cultures of HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, and H-1184 cells were in DMEM high glucose (Gibco Lab, Grand Island, NY) in 10% (MDA-MB-231 was 5%) bovine fetal serum and antibiotic 1X (streptomycin/penicillin 10000 U/mL, Gibco Lab Grand Island, NY). The culture of MCF-10A was in DMEM/F12 medium with 10% bovine fetal serum, incubated at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂.

Cytotoxic assay

The cytotoxic assay was measured using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Each cell line was plated in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well and incubated for 24 h (37 °C, 5% CO₂ air humidified) to allow them to adhere to the plate. Different concentrations of the CE and OE from *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* were prepared (from the stock solution) and added to the culture medium to treat the cells, and cells incubated for another 72 h under the same conditions, using cells without treatment as a negative control. At the end of the experimental period, 100 µL of MTT dissolved in medium (5 mg/mL) were added to each well and incubated for another 2.5 h. Then, the medium was removed, the formazan crystals dissolved in 150 µL DMSO, and the absorbance measured at 550 nm in a spectrophotometer (Sinergy Biotek Instruments, Winooski, VT). In order to determine viability and the concentration leading to 50% inhibition of the viability, the determination of IC₅₀ was by regression analysis using the following equation:

$$\% \text{ Viability} = \text{Abs treated cells} / \text{Abs control cells} \times 100$$

Statistical analysis

The results reported are as the mean and the standard deviation (SD) of at least two independent experiments. The data analysis was by One-way analysis of variance (ANOVA), followed by post-hoc Turkey test, using a significance level of $\alpha \leq 0.5$ to determine statistical significance. The statistical analysis software used for these analyses was Statistica 7.

RESULTS AND DISCUSSION

The characterization of organic extracts (OE) from *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* was by the analysis of the major peaks identified based on elution order, and that of all compounds was by interpreting their mass spectra obtained by the HPLC-ESI-MS, considering previously reported data. Figure 1 (A and B) shows the total ion chromatogram (TIC) of extracts from species studied. Several investigations reported cytotoxic effects of some Pine and oaks species on different cell lines that were related to compounds with the biological activities (Şöhretoğlu *et al.*, 2012; Moradi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2017; Sarmeili *et al.*, 2017).

Table 1 shows the main constituents of pine bark, where the compounds of the peaks 11, 12, 15, 16, 25, 36, 40, 41, and 58 coincide with compounds recently reported by Rosales (2017) in *P. durangensis* bark, demonstrating the presence of flavonoids like procyanidins and the abundance of taxifolin. Other TIC peak constituents were compared with the relevant literature in order to obtain a tentative identification (most studies on compounds of *Pinus* and *Quercus* bark) finding: kaempferol and eriodictyol ([M-H]⁻ 285 and 287 respectively; De la Luz Cádiz-Gurrea *et al.*, 2014), taxifolin-o-hexoside ([M-H]⁻ 465; Cretu *et al.*, 2013), β-hydroxypropiovanillone glucoside ([M-H]⁻ 357; Karonen *et al.*, 2004), HHDP-galloyl-glucose ([M-H]⁻ 357; Fernández *et al.*, 2009),

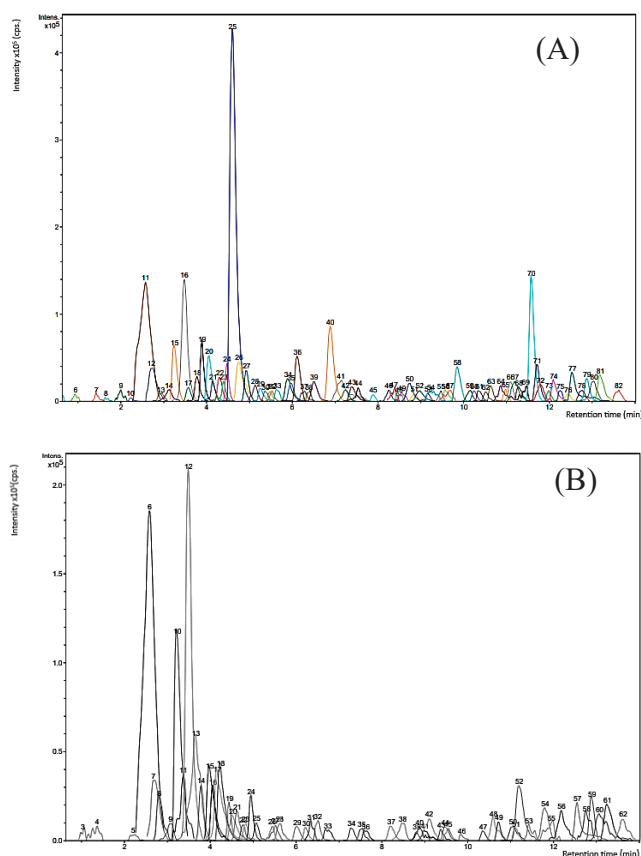


Fig. 1. Total ion chromatogram. (A) OE from *P. durangensis*. 11= Procyanidin dimer, 16= (+)-Catechin/(-)-Epicatechin, 25= Dihydroquercetin (Taxifolin), 40= Myricetin, 70= Kaempferol; (B) OE from *Q. sideroxylla*. 6= Procyanidin dimer, 10= Procyanidin dimer B1, 12= (+)-Catechin/(-)-Epicatechin; Procyanidin dimer, 13= (+)-Catechin/(-)-Epicatechin.

Fig. 1. Cromatografía de iones totales. (A) OE de *P. durangensis*. 11= Dímero de procianidina, 16= (+)-Catequina/(-)-Epicatequina, 25= Dihidroquercetina (Taxifolina), 40= Miricetina, 70= Kaempferol; (B) OE de *Q. sideroxylla*. 6= Dímero procianidina, 10= Dímero procianidina B1, 12= (+)-Catequina/(-)-Epicatequina; dímero Procianidina, 13= (+)-Catequina/(-)-Epicatequina.

trigalloyl glucose ([M-H]⁻ 635; Mucilli *et al.*, 2017), (Epi)catechin-3-O-glucoside-gallate ([M-H]⁻ 603; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2015), t-caftaric acid ([M-H]⁻ 311; Pardo-García *et al.*, 2014). The polyphenolic profiles of *Q. sideroxylla* shown in Table 2 includes procyanidin dimer of catechin/epicatechin compounds (peaks 6, 10, 12, and 13) which is, by far, the dominant polyphenols in bark extract from this species, also reported in previous studies (Rosales *et al.*, 2012). Other compounds present in the extract also compared with previously reported literature, resulted in the tentative identification of constituents such as Quercetin 3-O-glucoside and t-caftaric acid ([M-H]⁻ 463 and 311 respectively; Pardo-García *et al.*, 2014), Ellagic acid-rhamnoside ([M-H]⁻ 447; Santos *et al.*, 2013) gallic acid hexoside ([M-H]⁻ 331; Lorenz *et al.*, 2016), taxifolin ([M-H]⁻ 303; Rosales *et al.*, 2017). Other unknown compounds reported in barks detected in both extracts are also included ([M-H]⁻ 293; Mämmelä *et al.*, 2000).

In previous studies, we have identified some of the major phenolic compounds of crude *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* bark extracts by HPLC-DAD (Soto-García and

Table 1. Compounds identified by ESI-MS in the *P. durangensis* bark organic extract.

Tabla 1. Identificación de compuestos por ESI-MS en extractos orgánicos de corteza de *P. durangensis*.

| # Peak | RT (min) | Mass [m/z]- | Suggested compound |
|--------|----------|-------------|-------------------------------------|
| 11 | 2.6 | 577.1320 | Procyanidin dimer |
| 12 | 2.7 | 289.0699 | (+)-Catechin/(-)-Epicatechin |
| 15 | 3.3 | 577.1321 | Procyanidin dimer |
| 15 | 3.3 | 865.1916 | Procyanidin trimer |
| 16 | 3.5 | 289.0706 | (+)-Catechin/(-)-Epicatechin |
| 16 | 3.5 | 579.1490 | Catechin dimer |
| 19 | 3.9 | 465.1041 | Taxifolin-O-hexoside |
| 25 | 4.6 | 303.0506 | Dihydroquercetin (Taxifolin) |
| 34 | 5.9 | 633.1210 | HHDP-galoyl-glucose |
| 36 | 6.1 | 317.0616 | Myricetin |
| 36 | 6.1 | 635.1369 | Trigalloyl glucose |
| 39 | 6.5 | 287.0539 | Eriodictyol |
| 40 | 6.9 | 317.0639 | Myricetin |
| 40 | 6.9 | 635.1369 | Trigalloyl glucose |
| 41 | 7.1 | 331.0448 | Pinomyricetin (myricetin-6Me) |
| 50 | 8.7 | 357.1330 | b-hydroxypropiovanillone glucoside |
| 58 | 9.9 | 301.0679 | Quercetin |
| 58 | 9.9 | 603.1440 | (Epi)catechin-3-O-glucoside-gallate |
| 70 | 11.6 | 285.0759 | Kaempferol |
| 77 | 12.5 | 311.1854 | t-caftaric acid |
| 79 | 12.9 | 293.1740 | Unknown |

Rosales-Castro, 2016); these results, together with those obtained in this research, confirm the reproducibility of their bioactive compounds in bark extracts, like catechin in both species.

The *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* CE and OE bark cytotoxic effects were also evaluated on a cell line from human breast carcinoma, estrogen receptor-negative (ER-) MDA-MB-231, and cervix carcinoma cell line HeLa. Non-tumorous MCF-10A and HSF-1184 cells, used as controls, allowed comparing the effects produced by the extracts in healthy and tumor cells.

Results showed that crude extract and organic extract of both species have cytotoxic activity on cancer cell lines growth. A concentration-dependent manner (Fig. 2 A, B, C), becomes statistically different ($p \leq 0.05$) between treated and untreated cells (MDA-MB-231 and HeLa cell lines), nevertheless they were not cytotoxic to the non-tumorous HSF-1184 cell line.

The crude extracts showed a slight reduction in cell viability on normal breast MCF-10A cells, 20 % approximately (Fig. 2 D), even at the higher applied doses. These results

Table 2. Compounds identified by ESI-MS in the *Q. sideroxylla* bark organic extract.**Tabla 2.** Identificación de compuestos por ESI-MS en extractos orgánicos de corteza de *Q. sideroxylla*.

| # Peak | RT (min) | Mass [m/z]- | Suggested compound |
|--------|----------|-------------------|---|
| 6 | 2.6 | 577.1319 | Procyanidin dimer |
| 7 | 2.7 | 289.0702 | (+)-Catechin/(-)-Epicatechin |
| 10 | 3.2 | 577.1323 | Procyanidin dimer B1 |
| 12 | 3.5 | 289.0704;579.1489 | (+)-Catechin/ (-)-Epicatechin; Procyanidin dimer |
| 13 | 3.7 | 289.0702 | (+)-Catechin/(-)-Epicatechin |
| 14 | 3.8 | 577.1307 | Procyanidin dimer |
| 15 | 4.0 | 463.0873 | Quercetin 3-O-glucoside |
| 18 | 4.2 | 447.0920 | Ellagic acid-rhamnoside |
| 21 | 4.6 | 303.0498 | Dihydroquercetin |
| 37 | 8.2 | 331.2490 | Gallic acid hexoside |
| 57 | 12.5 | 311.1848 | t-caftaric acid |
| 59 | 12.9 | 293.1736 | Unknow |

indicate that the *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* extracts preferentially reduced the growth of the tumoral cell while not affecting the healthy cell line. The role of phenolic compounds in the extracts is essential, since it has been observed that polyphenols such as catechins induce apoptotic cell death in MDA MB-231 cell lines but not in normal cells (MCF 10-A) (Farhan et al., 2016). The CE of both species presents catechin in their compounds, explaining the selective effect on MCF-10A.

Several investigations reported that the effects obtained on cell proliferation relate to dose and cell type, implying a different sensitivity by different cell lines (Gezer et al., 2015; Anlar et al., 2016). It has also been reported that the selective activity of cytotoxic compounds against healthy (MCF-10A) and tumor cells is due to a broad spectrum of mechanisms responsible for the resistance. These include differences in the subcellular localization of Bik and differences in mitochondrial-mediated apoptosis that explain the sensitivity exerted by the bark extracts from *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* in the cell lines (Studzinska-Sroka et al., 2016).

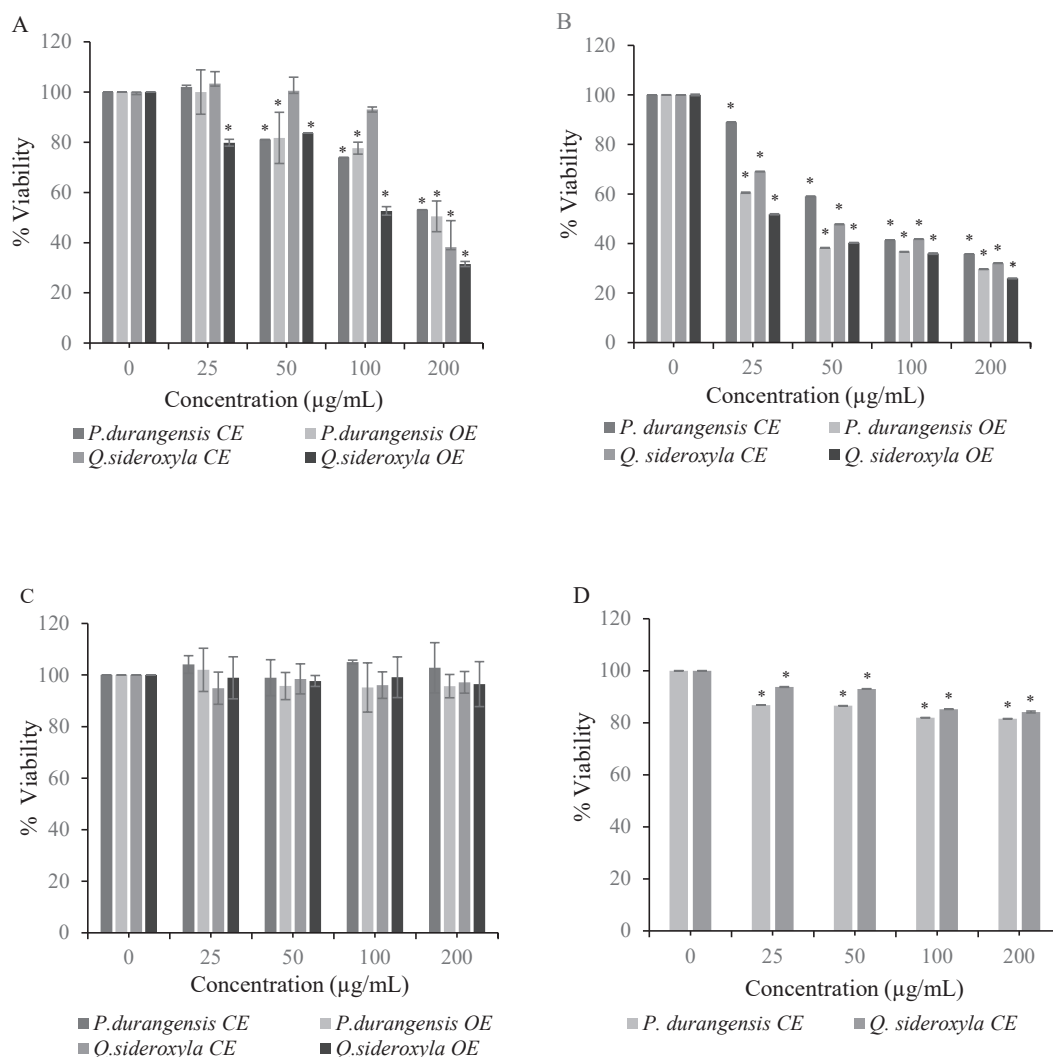


Fig. 2. Cytotoxic effect of *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* bark extracts on cells. (A) HeLa cells, (B) MDA-MB-231 cells, (C) HSF-1184 cells and (D) MCF-10A. Percent cell survival in the control group (untreated cells) assumed as 100. Results are expressed as the mean \pm SD of two independent experiments (n=4). Significant difference *p \leq 0.05 versus the control group.

Fig. 2. Efecto citotóxico de los extractos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* sobre las células. (A) Células HeLa, (B) Células MDA-MB-231, (C) Células HSF-1184 y (D) células MCF-10A. El porcentaje de supervivencia celular en el grupo de control (células no tratadas) se asumió como 100. Los resultados se expresan como la media \pm DE de dos experimentos independientes (n = 4). Diferencia significativa * p \leq 0.05 frente al grupo de control.

IC₅₀ determination provides further clarification of both species' crude and organic extracts behavior in different cell lines (Table 3). It shows that organic extracts of both species have a major cytotoxic effect on MDA-MB-231 and HeLa cells, maybe due to the concentration of metabolites exerted by solvent. Previous results report that compounds such as taxifolin and procyanidins, the most abundant present in each of the extracts, play a fundamental role in their cytotoxic activity, inducing apoptosis on upregulating the expression of the proteins in HeLa and MDA-MB-231 cells (Amalinei *et al.*, 2014).

Table 3. IC₅₀ for *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* bark extracts on cancer cell lines and non-tumorigenic cells.

Tabla 3. IC₅₀ de los extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* sobre la viabilidad de líneas celulares cancerosas y no tumorales.

| Extract | Cell lines | | | |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------|---------|
| | IC ₅₀ µg/mL | | | |
| | HeLa | MDA-MB-231 | HSF-1184 | MCF-10A |
| <i>P. durangensis</i> CE | 210.30±6.75 ^a | 77.34±4.06 ^a | ND | ND |
| <i>P. durangensis</i> OE | 201.50±8.29 ^a | 37.49±0.95 ^c | ND | — |
| <i>Q. sideroxylla</i> CE | 184.03±7.83 ^b | 46.83±0.73 ^b | ND | ND |
| <i>Q. sideroxylla</i> OE | 103.64±3.87 ^c | 32.82±5.54 ^c | ND | — |

ND: not detected within the investigated concentration range. Means ± SD in each column followed by different letters are statistically different by Tukey test $p \leq 0.05$.

The abundance of catechins and the synergy with other metabolites within the phenolic profile of *Q. sideroxylla* could be why it showed the highest cytotoxic activity compared to *P. durangensis*. In addition, there is evidence that flavonoids that possess C2-C3 unsaturated bond and a carbonyl group at position 4 exhibit lower IC₅₀. These two functional groups may increase the compound's activity by affording more stable flavonoid radicals via conjugation and electron delocalization (Sadeghi-Aliabadi *et al.*, 2012).

Several investigations reported cytotoxic effects of some *Pinus* and oaks species on different cell lines that were related to compounds with the biological activities (Şöhretoğlu *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Moradi *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2017; Sarmeli *et al.*, 2017).

CONCLUSIONS

Quercus and *Pinus* species studies are intense due to their antioxidant and anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer potential; however, studies on the phenolic profile is scarce, and is associated with the reported effect. This work demonstrated that the phenolic profile and the concentration of specific metabolites such as the procyanidin

dimer of catechin/epicatechin compounds was determinant in the cytotoxic activity evaluated in the cell lines used. *Q. sideroxylla* OE showed a potent cytotoxic activity compared to CE and OE from *P. durangensis*. This strong cytotoxic effect represents an opportunity for the valorization of the wood industry by-products, suggesting that OE of *Q. sideroxylla* may represent a good alternative in the search for new agents of natural origin to treat mammary and cervix cancer. Nevertheless, more *in vitro* and *in vivo* studies are necessary in order to understand and establish the mechanism of action.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to María del Socorro González Elizondo for the identification of the study species.

ETHICAL DISCLOSURES

The authors declare that this work did not required human or animal experiments, no patient data appear in this article, and declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Abdullah, A. S. H., Mohammed A. S., Abdullah R., Mirghani M.E.S., Al-Qubaisi M. 2014. Cytotoxic effects of *Mangifera indica* L. kernel extract on human breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines) and bioactive constituents in the crude extract. BMC Complementary and alternative medicine. 14(1): 1-10.
- Alzaharna, M., Alqouqa I., Cheung H. Y. 2017. Taxifolin synergizes Andrographolide-induced cell death by attenuation of autophagy and augmentation of caspase dependent and independent cell death in HeLa cells. PLoS One. 12(2): e0171325.
- Amalinei, R. L., Trifan A., Cioanca O., Miron S.D., Mihai C. T., Rotinberg P., Miron A. 2014. Polyphenol-rich extract from *Pinus sylvestris* L. bark—chemical and antitumor studies. Medical-Surgical Journal, 118(2): 551-557.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Ouchemoukh S., Meziant N., Idiri Y., Hernanz D., Stinco C. M. 2017. Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. Industrial Crops and Products. 95: 6-17.
- Anlar, H. G., Bacanlı M., Kutluk B., Ahmet, Başaran N. B. 2016. Cytotoxic Activity of Resveratrol in Different Cell Lines Evaluated by MTT and NRU Assays. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. 13(1): 27-34.
- Bermejo, B., Pontones J. B. 1999. Los pinos mexicanos y su utilización como especies introducidas de alto potencial en varios países del mundo. Segundo Simposio sobre Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina. CATIE. 8:249-253.
- Cretu, E., Karonen M., Salminen J. P., Mircea C., Trifan A., Charalambous V., Miron A. 2013. In vitro study on the antioxidant activity of a polyphenol-rich extract from *Pinus brutia* bark and its fractions. Journal of Medicinal Food. 16(11): 984-991.
- DelaLuzCádiz-Gurrea, M., Fernández-Arroyo S., Segura-Carretero A. 2014. Pine bark and green tea concentrated extracts: antioxidant activity and comprehensive characterization of

- bioactive compounds by HPLC–ESI–QTOF–MS. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(11): 20382-20402
- Evacuasiyany, E., Ratnawati H., Liana L. K., Widowati W., Maesaroh M., Mozef T., Risdian C. 2014. Cytotoxic and antioxidant activities of catechins in inhibiting the malignancy of breast cancer. *Oxidant and Antioxidants in Medical Science*. 3(2): 141-146.
- Farhan, M., Khan H.Y., Oves M., Al-Harrasi A., Rehmani N., Arif H., Ahmad A. 2016. Cancer therapy by catechins involves redox cycling of copper ions and generation of reactive oxygen species. *Toxins*, 8(2): 37.
- Fernandes, A., Fernandes I., Cruz L., Mateus N., Cabral M., De Freitas V. 2009. Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(23): 11154-11160.
- Gezer, C., Yücecan S., Rattan S. I. S. 2015. Artichoke compound cynarin differentially affects the survival, growth, and stress response of normal, immortalized, and cancerous human cells. *Turkish Journal of Biology*. 39(2): 299-305.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez J., Gabaldón-Hernández J.A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. 2015. RP-HPLC–ESI–QTOF/MS 2 based strategy for the comprehensive metabolite profiling of *Sclerocarya birrea* (marula) bark. *Industrial Crops Products*. 71: 214-234.
- Karonen, M., Hämäläinen M., Nieminen R., Klika K. D., Loponen J., Ovcharenko V.V., Pihlaja K. 2004. Phenolic extractives from the bark of *Pinus sylvestris* L. and their effects on inflammatory mediators nitric oxide and prostaglandin E2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(25): 7532-7540.
- Khosropanah, M. H., Dinarvand A., Nezhadhosseini A., Haghighi A., Hashemi S., Nirouza F., Dehghani H. 2016. Analysis of the antiproliferative effects of curcumin and nanocurcumin in MDA-MB231 as a breast cancer cell line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 15(1), 231.
- Li, Y. Y., Feng J., Zhang X. L., Li M. Q., Cui Y. Y. 2016. Effects of *Pinus massoniana* bark extract on the invasion capability of HeLa cells. *Journal of Functional Foods*. 24: 520-526.
- Lorenz, P., Heinrich M., García-Käufer M., Grunewald F., Messerschmidt V, Herrick A., Steinborn C. 2016. Constituents from oak bark (*Quercus robur* L.) inhibit degranulation and allergic mediator release from basophils and mast cells in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*. 194: 642-650.
- Luna-José, A. D. L., Montalvo-Espinosa L., Rendón-Aguilar B. 2003. Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 72: 107-117.
- Mämmelä, P., Savolainen H., Lindroos L., Kangas J., Vartiainen T. 2000. Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 891(1): 75-83.
- Marvibaigi, M., Amini N., Supriyanto E., Majid F.A.A., Jaganathan S.K., Jamil S., Nasiri R. 2016. Antioxidant Activity and ROS-Dependent Apoptotic Effect of *Scurrula ferruginea* (Jack) Danser Methanol Extract in Human Breast Cancer Cell MDA-MB-231. *PLoS One*. 11(7): e0158942.
- Moradi, M. T., Karimi A., Alidadi S. 2016. In vitro antiproliferative and apoptosis-inducing activities of crude ethyle alcohol extract of *Quercus brantii* L. acorn and subsequent fractions. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 14(3): 196-202.
- Moreira, L., Araújo I., Costa, Correia-Branco A., Faria A., Martel F., Keating E. 2013. Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental Cell Research*. 319(12): 1784-1795.
- Moreno-Jiménez, M. R., Trujillo-Esquivel, F., Gallegos-Corona M. A., Reynoso-Camacho M. A., González-Laredo R. F., Gallegos-Infante J. A., Ramos-Gómez M. 2015. Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine. *Food Chemical Toxicology*. 80: 144-153.
- Muccilli, V., Cardullo N., Spatafora C., Cunsolo V., Tringali C. 2017. α -Glucosidase inhibition and antioxidant activity of an oenological commercial tannin. Extraction, fractionation and analysis by HPLC/ESI-MS/MS and ^1H NMR. *Food Chemistry*. 215: 50-60.
- Pardo-García, A. I., Martínez-Gil A. M., Cadahía E., Pardo F., Alonso G. I., Salinas M. R. 2014. Oak extract application to grapevines as a plant biostimulant to increase wine polyphenols. *Food Research International*. 55: 150-160.
- Rameshthangam, P. y Chitra, J. P. 2017. Synergistic anticancer effect of green synthesized nickel nanoparticles and quercetin extracted from *Ocimum sanctum* leaf extract. *Journal of Materials Science & Technology*. 34(3): 508-522.
- Rosales-Castro, M. y González- Laredo, R. F. 2003. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques*, 9: 41-49.
- Rosales-Castro, M., Pérez López, M. E., Ponce Rodríguez, M. D. C. 2006. Propiedades antirradicales libres y antibacterianas de extractos de corteza de pino. *Madera y Bosques*, 12: 37-49.
- Rosales-Castro, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán N. E., Gallegos-Infante J. A., Rivas-Arreola, M. J., Karchesy, J. 2012. Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxyla* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Holzforschung*. 66: 577-584.
- Rosales-Castro, M., González-Laredo, R. F., Rivas-Arreola, M. J., Karchesy, J. 2017. Chemical analysis of polyphenols with antioxidant capacity from *Pinus durangensis* bark. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 37(5): 393-404.
- Sadeghi-Aliabadi, H., Mosavi H., Mirian M., Kakhki S., Zarghi A. 2012. The Cytotoxic and Synergistic Effects of Flavonoid Derivatives on Doxorubicin Cytotoxicity in HeLa, MDA-MB-231, and HT-29 Cancer Cells. *Iranian Journal of Toxicology*, 5(15): 558-564.
- Saenglee, S., Jogloy, S., Patanothai, A., Leid, M., Senawong, T. 2016. Cytotoxic effects of peanut phenolics possessing histone deacetylase inhibitory activity in breast and cervical cancer cell lines. *Pharmacological Reports*. 68(2): 1102-1110.
- Santos, S. A., Villaverde, J. J., Sousa, A. F., Coelho, J. F., Neto, C. P., Silvestre, A. J. 2013. Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. *Industrial Crops and Products*. 47: 262-269.
- Sarvmeili, N., Jafarian-Dehkordi, A., Zolfaghari, B. 2016. Cytotoxic effects of *Pinus eldarica* essential oil and extracts on HeLa

- and MCF-7 cell lines. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(6): 476-483.
- Şöhretoğlu, D., Sabuncuoğlu, S., Harput, Ü. Ş. 2012. Evaluation of antioxidative, protective effect against H₂O₂ induced cytotoxicity, and cytotoxic activities of three different *Quercus* species. *Food and Chemical Toxicology*. 50(2): 141-146.
- Sorice, A., Guerriero E., Volpe M.G., Capone F., La Cara F., Ciliberto G., Costantini S. 2016. Differential Response of Two Human Breast Cancer Cell Lines to the Phenolic Extract from Flaxseed Oil. *Molecules*. 21(3): 319-337.
- Soto-García, M., Rosales-Castro, M., Escalona-Cardoso, G. N., Paniagua-Castro, N. 2016. Evaluation of Hypoglycemic and Genotoxic Effect of Polyphenolic Bark Extract from *Quercus sideroxylla*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 4032618.
- Soto-García, M. y Rosales-Castro M. 2016. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18: 701-714.
- Studzińska-Sroka, E., Piotrowska, H., Kucińska, M., Murias, M., Bylka, W. 2016. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines. *Pharmaceutical Biology*. 54(11): 2480-2485.
- Yang, I. H., Shin, J. A., Kim, L. H., Kwon, K. H., Cho, S. D. 2016. The caspase 3-dependent apoptotic effect of pycnogenol in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 15-7.

Uso de cepas de *Pycnoporus sanguineus* para la producción de enzimas con potencial uso en la industria de la panificación

Use of *Pycnoporus sanguineus* strains to the production of enzymes with potential applications on the bread industry

Susana Daniela Salinas Sánchez¹, Iosvany López-Sandin², Carlos E. Hernández-Luna³, Juan Francisco Contreras-Cordero³, Gerardo Méndez-Zamora¹, Carlos A. Hernández-Martínez¹, Guadalupe Gutiérrez-Soto^{1*}.

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Francisco Villa S/N., Col. Ex Hacienda El Canadá, General Escobedo, Nuevo León, México. ZP. 66050.

² Dpto. de Mecánica Aplicada, Facultad de Ciencias Técnicas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón, Km 9 ½, Ciego de Ávila, Cuba. ZP. 69450.

³ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Pedro de Alba S/N., Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. ZP. 66455.

RESUMEN

El uso de enzimas como α -amilasas, xilanasas y glucosidasas es una buena alternativa para obtener una mayor eficiencia en los productos de la industria panificadora, sin dejar de mencionar la lacasa que ha mostrado un potencial prometedor. Así, el objetivo de este estudio fue obtener concentrados enzimáticos de xilanasas, amilasas, celulasas y lacasas a partir de cepas nativas de *Pycnoporus sanguineus*. Para lo cual, se evaluó el efecto del medio de cultivo sobre la producción de lacasa juntamente con el escrutinio en medio sólido para la detección de xilanasas, amilasas y celulasas. A los concentrados enzimáticos obtenidos se les determinaron las unidades de lacasa y carbohidrolasas. Los títulos más altos de lacasa se presentaron en el medio Tx2. Con respecto a las carbohidrolasas, se detectaron en diferentes niveles de actividad y combinaciones. El concentrado con altos niveles de amilasa y lacasa fue CH116, mientras que LE90 tuvo la mayor actividad de xilanasas y LE133 de celulosa. La cepa CH116 fue productora de amilasa, celulosa, xilanasas y lacasa, siendo la de mayor potencial en la industria panificadora, mientras que LE90 puede ser utilizada en la industria papelera por su combinación de xilanasas y lacasa.

Palabras clave: basidiomicetos, carbohidrolasas, cepas nativas, lacasa

ABSTRACT

The use of enzymes such as α -amylases, xylanases and glucosidases is a good alternative to obtain higher efficiency in the bakery industry, not to mention laccase which has shown promising potential. Thus, the objective of this study was to obtain enzyme concentrates of xylanases, amylases, cellulases and laccases from *Pycnoporus sanguineus* native strains. For which, the effect of culture medium on the laccase production was evaluated together with the solid medium screening of xylanases, amylases and cellulases. Laccase and carbohydrolases units were determined from the enzyme concentrates obtained. The higher laccase titers occurred in the Tx2 medium. Regarding carbohydrolases, they were pre-

sent at different levels of activity and combinations. The concentrate with higher titers of amylase and laccase was CH116, while LE90 had the greater xylanase activity and LE133 of cellulase. The CH116 strain was a producer of amylase, cellulase, xylanase and laccase, being the one with the higher potential in the bakery industry, while LE90 in the paper industry, due to its combination of xylanases and laccase.

Key words: basidiomycetes, carbohydrolases, laccase, native strain.

INTRODUCCIÓN

A nivel industrial se destaca el uso de las enzimas en todos los sectores (alimentos, piensos, detergentes, textiles, lavandería, farmacéutica, cosmética y química fina), representando el 80 % del mercado mundial de las enzimas. En este contexto, las enzimas alimentarias son las más utilizadas y comprenden la mayor parte del mercado (Miguel *et al.*, 2013). Si bien, las enzimas pueden ser obtenidas a partir de plantas o animales, la mayoría son de fuentes microbianas. Estos organismos tienen ventajas como rápidas tasas de crecimiento, altos rendimientos y son relativamente fáciles de manipular genéticamente (Patel *et al.*, 2017). Por lo que, constantemente se buscan nuevas fuentes de enzimas, capaces de producir altos niveles en medios de bajo costo (Kathirgamanathan *et al.*, 2017).

La industria alimentaria ha desarrollado procesos enzimáticos para su uso en la producción de alimentos, con aplicaciones como la extracción de compuestos bioactivos, mejorar la textura y reducir los riesgos a la seguridad alimentaria (Zhang *et al.*, 2018). Entre otras ventajas, la aplicación de enzimas ha sido elegida ante otros aditivos por la demanda de componentes naturales, además de satisfacer los requerimientos de calidad con sus efectos positivos en procesos como la producción de edulcorantes y panificación (Singh *et al.*, 2019). En particular, la industria de panificación ha usado estas biomoléculas con el propósito de mejorar las características de la masa y el pan, así como aumentar sus atributos nutricionales (Tebben *et al.*, 2018).

*Autor para correspondencia: Guadalupe Gutiérrez Soto
 Correo electrónico: ggutierrez0402@gmail.com

Recibido: 9 de agosto de 2021

Aceptado: 20 de septiembre de 2021

En este sentido, el cumplimiento de los estándares de calidad del pan se obtiene a partir de mezclas complejas de enzimas de diferentes fuentes que actúan sinérgicamente en distintos componentes de la masa. Inicialmente, éstas eran obtenidas a partir de estómagos de terneros, corderos y cabritos. Actualmente, estas biomoléculas se producen industrialmente a partir de microorganismos por su fácil manipulación genética y ventajas en comparación a las enzimas de fuentes animales y vegetales (Singh y Kumar, 2019). Además, el uso de microorganismos en la producción de enzimas a gran escala vuelve el proceso económico y versátil por sus cortos tiempos de producción (Patel *et al.*, 2016).

Entre los microorganismos destacan los hongos por su capacidad de romper biopolímeros como la celulosa o el almidón, convirtiéndolos en una potencial fuente de enzimas degradadoras a nivel industrial. Sin embargo, la producción de enzimas se realiza a partir de la disponibilidad de sustratos que la especie está adaptada a degradar (Drozłowska, 2019). En este sentido, los hongos de la pudrición blanca (WRF) sobresalen entre las especies de basidiomicetos por su capacidad de degradar lignina y celulosa, asociado a la producción de enzimas lignocelulolíticas que les permiten asimilar los compuestos y crecer en diferentes sustratos. Sin embargo, por su baja producción ha sido investigada la inducción de enzimas de WRF para su aplicación a nivel industrial a bajo costo (Vrsanska *et al.*, 2016). Otra alternativa para obtener altos títulos de producción es la prospección de nuevas cepas con alto potencial lignocelulolítico. Uno de los géneros que han destacado en este tipo de estudios es *Pycnoporus* (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015). Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial lignocelulolítico de tres cepas nativas de *Pycnoporus sanguineus* para obtener concentrados enzimáticos con potencial aplicación en la industria de la panificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las cepas *Pycnoporus sanguineus* LE90, LE133 y CH116 son cepas nativas del estado de Nuevo León, resguardadas en el Laboratorio de Enzimología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las cepas fueron reactivadas en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, BD Bioxon, México) por 5 días para la preparación del inóculo.

Actividad lacasa

La actividad lacasa fue determinada midiendo la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP) a 468 nm [$\epsilon_{468} = 49,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. La mezcla de reacción fue preparada en una solución amortiguadora de acetato de sodio (200 mM), ajustado a pH 3.5 con 2 mM de DMP (Abadulla *et al.*, 2000). Las actividades enzimáticas se expresaron en unidades (U) definidas como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de producto por minuto. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo por triplicado a 25 °C en un espectrofotómetro UV-Vis 1800 (Shimadzu, Japon).

Carbohidrolasas y azúcares reductores

Las actividades celulasas, xilanasas y amilasas fueron detectadas determinando la cantidad de azúcares reductores liberados en la reacción siguiendo el método establecido por Miller *et al.* (1959). Las mezclas de reacción consistieron en 0.5 mL de la solución amortiguadora citrato de sodio (50 mM), ajustado a pH 5.0, 0.3 mL de sustrato 1 % (w/v) dependiendo de la actividad a determinar (CM-celulosa, número de catálogo C4146; D-xilano, número de catálogo X0502; o almidón, número de catálogo 33615; Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA)) y 0.2 mL de muestra. Las reacciones fueron incubadas por 15 min a 60 °C. Para la cuantificación azúcares reductores fueron agregados 0.1 mL de la mezcla de reacción a 0.1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller *et al.*, 1959), fueron hervidas durante 5 min a 100 °C y posteriormente sumergidas en un baño con hielo a -4 °C. Después, para determinar fotométricamente la absorbancia de las muestras se les agregó 1 mL de agua bidestilada y se procedió a leer a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-Vis 1800, Japon). Para la cuantificación de las celulasas y amilasas fue utilizada una curva de glucosa en un rango de 0 a 1 mg, para las xilanasas fue utilizada una curva de xilano en el mismo rango. Una unidad de enzima (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de glucosa o xilano por minuto. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo por triplicado a 25 °C.

Cinética de producción de lacasa

La cinética de producción y el efecto de la composición del medio sobre lacasa fueron realizados en medio Kirk modificado (Pozdnyakova *et al.*, 2006). La composición consistió en 5 g l⁻¹ de peptona (Bacto peptone, BD BIOXON México), 1 g l⁻¹ de extracto de levadura (BD BIOXON México), 2 g l⁻¹ de tartrato de amonio, 1 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0.5 g l⁻¹ de MgSO₄, 0.5 g l⁻¹ de KCl, 10 mL l⁻¹ de la solución de elementos DMS 100x. La solución DMS contenía 5 g l⁻¹ de EDTA, 2 g l⁻¹ de FeSO₄, 0.1 g l⁻¹ de ZnSO₄, 0.03 g l⁻¹ de MnCl₂, 0.3 g l⁻¹ de H₂BO₃, 0.2 g l⁻¹ de CoCl₂, 0.01 g l⁻¹ de CuSO₄ y 0.03 g l⁻¹ de NaMoO₄. A partir de este fueron establecidas tres condiciones de medio de cultivo, donde el medio Tx1 fue elaborado con All Bran Flakes® (BF) al 2 % como fuente de carbono. El medio Tx2 además del BF al 2 %, fue suplementado con CuSO₄ (350 μM) como inductor de lacasa. El medio Tx3 contenía glucosa (10 g l⁻¹) y xilano (20 g l⁻¹) como fuentes de carbono y CuSO₄ (350 μM). Los ingredientes declarados en el producto comercial a base de salvado de trigo BF son: trigo integral (59 %), salvado de trigo (18 %), harina de trigo integral, azúcar, extracto de malta de cebada, jarabe de glucosa, sal, aroma natural. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, a 15 lb por 15 min. Posteriormente, fueron inoculados con tres cilindros de 0.5 cm de diámetro, tomados de la periferia de cultivos con 5 días de crecimiento. La incubación fue realizada en un agitador orbital con control de temperatura (New Brunswick Scientific Co. G 25 Inc., Edison, NJ, USA) a 28 °C y 150 rpm. Alícuotas de 2 mL fueron tomadas cada tercer día por un periodo de 30 días, las cuales fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Potenciales hemicelulolítico y amilolítico

La evaluación de los potenciales hemicelulolítico y amilolítico fue realizada en medio sólido, utilizando los medios descritos por Sin *et al.* (2002). El medio base consistió en 0.1 % de peptona, 0.01 % de extracto de levadura y 1.6 % de agar, suplementado con carboximetilcelulosa (2 %), xilano (2 %) o almidón (2 %) para determinar la actividad de celulasas, xilanasas y amilasas, respectivamente. Los medios fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C y 15 lb por 15 min. Una vez vertidos en las placas Petri, fueron inoculados en el centro con un cilindro de 0.5 cm de diámetro tomado de la periferia de cultivos con 5 días de crecimiento. Los medios fueron incubados a 28 °C. El diámetro del crecimiento fue medido diariamente por tres días con un vernier. Para determinar el diámetro de hidrólisis enzimática fue utilizada una solución de yodo-yoduro. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El índice de degradación (ID) fue estimado con la siguiente fórmula:

$$ID = \frac{D}{C} \quad (1)$$

Donde: D es el diámetro de degradación y C es el diámetro de crecimiento.

Obtención de concentrados enzimáticos

Una vez definidas las cinéticas de producción de lacasa y seleccionado el medio de mayor producción, fueron preparados matraces de 2 l, conteniendo 1 l del medio seleccionado, previamente esterilizado e inoculado con seis cilindros de 0.5 cm de diámetro tomado de la periferia de cultivos con 5 días de crecimiento. Los cultivos fueron incubados en un agitador orbital con control de temperatura (New Brunswick Scientific Co. G 25 Inc., Edison, NJ, USA) a 28 °C y 150 rpm. A los 18 días de crecimiento, los sobrenadantes fueron recuperados por filtración y posteriormente concentrados con un cartucho de ultrafiltración con corte molecular de 10kDa en una membrana tipo espiral prep/scale TFF-6 PLCC (Merck Millipore, Germany). Después de ser recuperados los concentrados enzimáticos, fueron determinados los títulos de lacasa, celulasas, xilanasas y amilasas. Finalmente, fueron almacenados en congelación a -20 °C hasta su uso.

Análisis estadístico

La significancia estadística en la actividad enzimática en medio sólido y líquido fue determinada mediante un análisis de varianza ANOVA y posterior comparación de medias con una prueba Tukey ($P < 0.05$). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa estadístico computacional InfoStat Versión 2020e.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de producción de lacasa

La cinética de producción para la cepa LE90 mostró la mayor producción en el medio Tx2, seguido por Tx3 (Figura 1A). En ambos medios se observó un incremento en la

Tabla 1. Análisis de varianza de la producción de lacasa en diferentes medios.

Table 1. Analysis of variance of laccase production in different media.

| F.V. | G.L. | C.M. |
|-------|------|---------------|
| Rep | 2 | 2169.18ns |
| Cepa | 2 | 24465.25* |
| Medio | 2 | 11401853.68** |
| Error | 74 | 6905.18 |
| C.V. | | 12.76 |

F.V.= fuente de variación; G.L.= grados de libertad; C.M.= cuadrados medios; Rep= repetición; C.V.= coeficiente de variación. **, $P < 0.01$. *, $P < 0.05$. ns, $P > 0.05$.

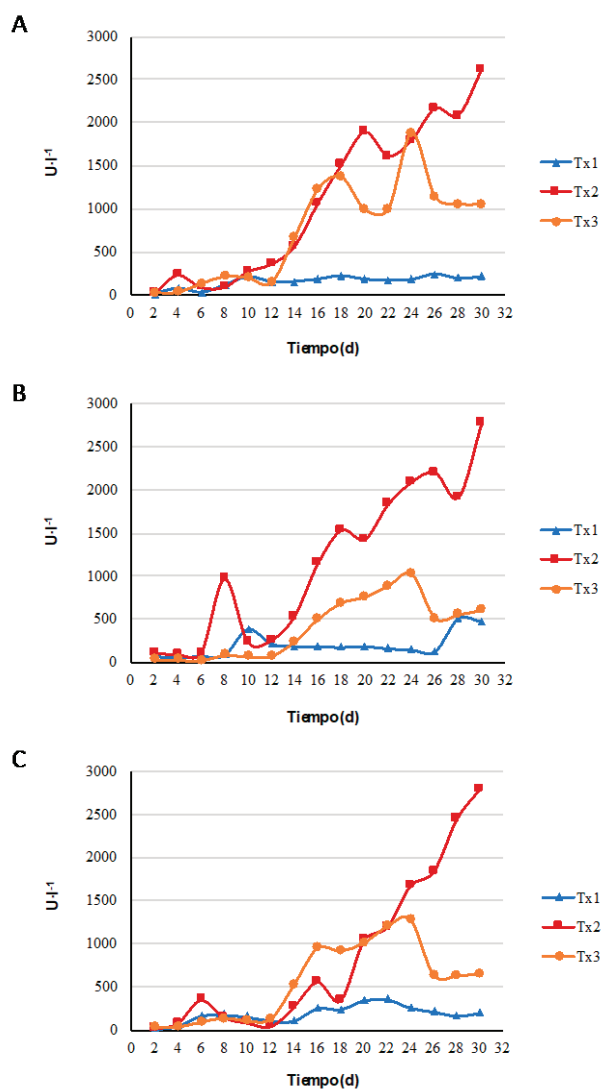


Figura 1. Curvas de producción de lacasa por *Pycnoporus sanguineus*. Donde A) corresponde a la cepa LE90, B) LE133 y C) CH116 cultivadas en los tres medios de cultivo.

Figure 1. Laccase production curves by *Pycnoporus sanguineus*. Where A) corresponds to strain LE90, B) LE133 and C) CH116 grown in the three-culture media.

producción a partir del día 14, con picos máximos los días 20 (1888.72 U·l⁻¹), 26 (2161.62 U·l⁻¹) y 30 (2617.78 U·l⁻¹) para Tx2 y los días 18 (1367.59 U·l⁻¹) y 24 (1876.49 U·l⁻¹) para Tx3. El medio Tx1 fue el de menor producción, con títulos menores a 400 U·l⁻¹.

Las curvas de producción de lacasa para la cepa LE133 (Figura 1B) mostraron la mayor actividad en Tx2, donde la actividad incrementó sus títulos a partir del día 18 manteniendo el incremento a lo largo del tiempo hasta alcanzar 2792.36 U·l⁻¹ al día 30. En el medio Tx3, la mayor producción fue observada entre los días 14 y 24, disminuyendo a partir del día 26. En el medio Tx1, LE133 mostró el mismo comportamiento que la cepa LE90, pero con menores títulos de producción.

En la Figura 1C se muestran las curvas de producción de la cepa CH116, que presentó los mayores títulos de producción en el medio Tx2, con un comportamiento ascendente a partir del día 14 y con picos máximos al día 16 (1144.21 U·l⁻¹), 26 (2197.64 U·l⁻¹) y 30 (2776.97 U·l⁻¹). En el medio Tx1 fueron registrados los menores títulos de actividad. A diferencia de las cepas LE90 y LE133, CH116 mostró títulos inferiores a 1000 U·l⁻¹ en el medio Tx3.

En general, las tres cepas alcanzaron la mayor producción de lacasa en el medio Tx2. LE90 y CH116 mostraron un incremento exponencial a partir día 12 hasta el día 16. Sin embargo, existieron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas ($P \leq 0.05$) y los medios utilizados ($P \leq 0.01$). En la tabla 2 son mostrados los resultados de la producción de lacasa en el medio Tx2, donde se comparan los títulos de las tres cepas en los días con mayor actividad, que podría estar asociado a la producción de diferentes isoformas.

Hay que destacar que *Pycnoporus sanguineus* es un género de basidiomicetos productor de lacasas termoestables (Orlikowska *et al.*, 2018) con alto potencial redox (Zimbardi *et al.*, 2016), considerando que la composición del medio influye en los títulos de producción (Zimbardi *et al.*, 2016). Lo que explica, que las cepas estudiadas en el presente trabajo tuvieron la mayor actividad en el medio de cultivo Tx2. Además, éste podría ser el resultado de la presencia de inductores naturales como los componentes de pared celular del salvado de trigo (Riegas-Villalobos *et al.*, 2020) y al cobre suplementado como inductor inorgánico (Zhuo *et al.*, 2017). Sin embargo, los títulos fueron menores a lo reportado para la cepa *P. sanguineus* CS43 en condiciones similares de cultivo (Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014), pero similares a los observados en la cepa *Pycnoporus sanguineus* CS2 (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015). Estas diferencias entre cepas pueden ser explicadas por la presencia de glucosa como fuente principal de carbono en combinación con otros inductores.

Por otro lado, la producción tuvo un comportamiento ascendente no lineal, cuyos picos podrían indicar la presencia de isoformas de lacasas, principalmente en los medios suplementados con cobre (Pezzella *et al.*, 2012; Vrsanska *et al.*, 2016). En este sentido, generalmente las cepas de *Pycnoporus sanguineus* producen al menos dos isoformas de lacasa (Li *et al.*, 2016; Salazar-López *et al.*, 2017; González-Bautista, 2019). La diversidad en las isoformas producidas por los hongos

Tabla 2. Actividad lacasa de cepas *Pycnoporus sanguineus* en el medio de cultivo Tx2.

Table 2. Laccase activity of *Pycnoporus sanguineus* strains in Tx2 culture medium.

| Día | Cepa | | |
|-----|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | LE90 (U·l ⁻¹) | LE133 (U·l ⁻¹) | CH116 (U·l ⁻¹) |
| 10 | 277.13 ± 16.99 a | 87.83 ± 8.97 c | 228.48 ± 10.79 b |
| 16 | 1071.37 ± 75.02 a | 558.57 ± 3.27 b | 1144.21 ± 6.47 a |
| 18 | 1511.53 ± 53.95 a | 343.32 ± 37.38 b | 1527.39 ± 24.92 a |
| 20 | 1888.72 ± 35.16 a | 1036.49 ± 8.62 c | 1420.81 ± 23.42 b |
| 26 | 2161.62 ± 10.4 a | 1834.69 ± 15.94 b | 2197.64 ± 22.22 a |
| 30 | 2617.78 ± 42.19 a | 2792.36 ± 62.56 a | 2776.97 ± 73.16 a |

Tx2: medio con All Bran Flakes® (BF) al 2 %, suplementado con CuSO₄ (350 µM); LE90, LE133 y CH116: cepas de *Pycnoporus sanguineus* nativas del estado de Nuevo León. Las medias con diferentes letras minúsculas dentro de la misma fila representan diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $P < 0.05$).

de esta especie sugiere una mayor capacidad para acceder a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, lo cual le concede un poder de adaptación en disímiles ambientes de crecimiento (Bertrand *et al.*, 2015). El análisis de las isoformas constitutivas e inducidas de las cepas será abordado en otros estudios.

Potenciales hemicelulolítico y amilolítico

En la Figura 2 se presentan los resultados de los potenciales hemicelulolítico y amilolítico. La producción de amilasas no mostró diferencia estadísticamente significativa entre las cepas ($P > 0.05$), mientras que las celulasas y xilanasas si mostraron diferencias ($P \leq 0.05$). Las cepas LE133 y CH116 tuvieron valores del ID de 1.2 para la celulosa. En cambio, CH116 mostró mayor actividad de xilanasas con índices de degradación mayores a 1.0. De forma general, las tres cepas mostraron mayor actividad de celulolítica concordando con lo reportado en aislados nativos de Nuevo León por Medina-González *et al.* (2016). Sin embargo, los ID de las cepas de *P. sanguineus* fueron menores al rango mencionado por estos mismos autores de 1.032-2.559 y 1.077-1.188 para celulosa

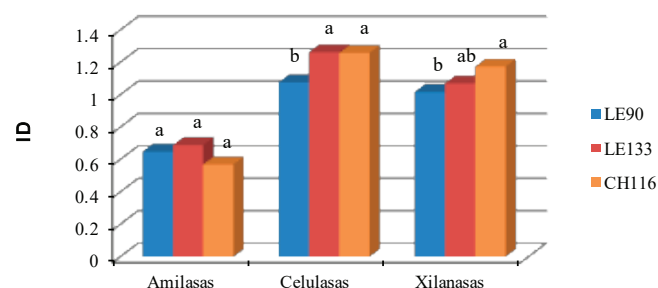


Figura 2. Índice de degradación enzimática (ID) de las cepas *Pycnoporus sanguineus*. Las medias con diferentes letras minúsculas dentro de la misma clasificación representan diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $P < 0.05$).

Figure 2. *Pycnoporus sanguineus* strains enzyme degradation index (ID). The means with different lowercase letters within the same classification represent a statistically significant difference (Tukey, $P < 0.05$).

y xilano, respectivamente. Este comportamiento puede ser explicado a nivel de secretoma para esta especie que, bajo condiciones de cultivo ricas en lignocelulosa, el 2 % de las enzimas producidas por este hongo corresponden a las de actividad celulolítica y otro 2 % a las hemicelulolíticas, mientras que las enzimas lignolíticas comprenden alrededor del 9 % (Gauna *et al.*, 2020).

Independientemente de los bajos niveles de celulasas y xilanasas es necesario un estudio de las condiciones óptimas de producción, ya que otras investigaciones han demostrado que estas actividades responden positivamente a la presencia de sustratos ricos en lignocelulosa (Rohr *et al.*, 2013), sugiriendo bajos costos de producción enzimática.

Con respecto al potencial amilolítico, las cepas presentaron índices de degradación entre 0.57 y 0.69, menores a los reportados para *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* por Khokhar *et al.* (2011). Sin embargo, cabe mencionar que las enzimas producidas por cepas *Pycnoporus sanguineus* han mostrado termoestabilidad (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015; Orlikowska *et al.*, 2018), lo que las hace atractivas para su aplicación a nivel industrial.

Consumo de azúcares reductores

Una vez identificadas las actividades de amilasas, celulasas y xilanasas en medio sólido, se determinó el comportamiento del consumo de azúcares en medio líquido, asociado a la producción de amilasas y hemicelulasas.

En la tabla 3 es mostrado el análisis de varianza, donde se observa diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) entre el comportamiento de las cepas y los días de estudios, con interacción entre estos. En la figura 3 se presenta el consumo de los azúcares de las cepas, donde en los primeros ocho días se observó un alto consumo (aproximadamente el 55 %). Entre los días 10 y 18 la concentración disminuye cerca del 80 %, manteniendo un comportamiento de lento consumo, sugiriendo que los productos del metabolismo secundario aparecerán después del día 14 y que coincide con el incremento de la actividad de lacasa (Figura 1). Además, las fluctuaciones en la concentración de azúcares observadas los días 10 y 20 pueden estar asociadas a la presencia de enzimas que son inducibles (Álvarez *et al.*, 2016). Cabe mencionar que el comportamiento observado entre los días 10 y 18 sugiere el término del metabolismo primario y el comienzo del metabolismo secundario.

Por otro lado, cabe mencionar que los basidiomicetos de la pudrición blanca se caracterizan por su potencial lignolítico (Riegas-Villalobos *et al.*, 2020), además de producir amilasas, xilanasas y celulasas como parte de su metabolismo primario en presencia de almidón y componentes de pared celular (Kobakhidze *et al.*, 2016; Naidu *et al.*, 2016). Por lo que, al agotarse los azúcares simples presentes en el medio, serán expresadas las enzimas implicadas en la degradación de estos biopolímeros (Valadares *et al.*, 2019; Okal *et al.*, 2020). Esto puede observarse en la cinética del consumo de azúcares en el medio Tx2 (BF), un medio complejo compuesto por trigo integral, salvado de trigo y harina de trigo, que lo hacen

Tabla 3. Análisis de varianza del consumo de azúcares reductores.

Table 3. Analysis of variance of reducing sugar consumption

| F.V. | G.L. | C.M. |
|----------|------|-----------|
| Día | 11 | 0.21** |
| Rep | 3 | 0.01** |
| Día*Rep | 33 | 0.0017 |
| Cepa | 2 | 0.01** |
| Cepa*Día | 22 | 0.0032** |
| Cepa*Rep | 6 | 0.00019** |
| Error | 66 | 0.00057 |
| C.V. | | 11.21 |

F.V.= fuente de variación; G.L.= grados de libertad; C.M.= cuadrados medios; Rep= repetición; C.V. = coeficiente de variación. **, $P < 0.01$.

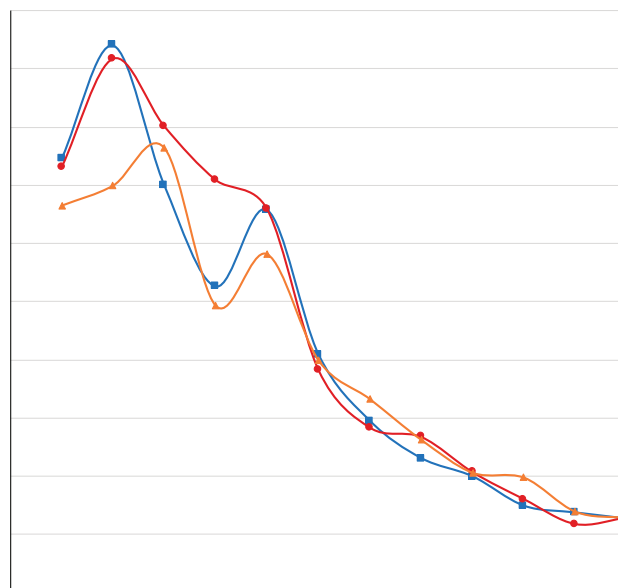


Figura 3. Consumo de azúcares por cepas *Pycnoporus sanguineus*.

Figure 3. Reducing sugar consumption by *Pycnoporus sanguineus* strains.

rico en almidón y hemicelulosa (Gómez *et al.*, 2020). Además, el cereal está adicionado con otros carbohidratos como sacarosa, extracto de malta de cebada y jarabe de glucosa que contribuyen al contenido de carbono.

Obtención de concentrados enzimáticos

En la Tabla 2 son mostrados los títulos de actividad de amilasas, celulasas, xilanasas y lacasa presentes en los concentrados obtenidos de los cultivos al día 18. La principal actividad producida por todas las cepas fue la de lacasa. El cóctel obtenido a partir de la cepa CH116 tuvo los mayores títulos de lacasa ($4500 \text{ U}\cdot\text{l}^{-1}$) y amilasa ($485 \text{ U}\cdot\text{l}^{-1}$), mientras que LE90 mostró la mayor concentración de xilanasas ($785 \text{ U}\cdot\text{l}^{-1}$). El concentrado LE133 fue el de mayor actividad de celulasas.

Por otra parte, los concentrados enzimáticos mostraron un patrón común de producción de enzimas, siendo la lacasa la más abundante, seguida de las xilanasas, amilasas y finalmente las celulasas. Este comportamiento concuerda con lo reportado para este género (Gauna *et al.*, 2020). Por lo que, los bajos niveles observados podrían incrementarse mediante combinaciones de fuentes de carbono y sustratos

Tabla 4. Actividad de los concentrados de cepas nativas de *Pycnoporus sanguineus*.**Table 4.** Enzyme concentrates activity of native *Pycnoporus sanguineus* strains.

| Enzimas | Cepa | | |
|-----------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | LE90 (U·l ⁻¹) | LE133 (U·l ⁻¹) | CH116 (U·l ⁻¹) |
| Xilanasas | 785 | 328 | 128 |
| Celulasas | 0.0 | 271 | 120 |
| Amilasas | 86 | 29 | 485 |
| Lacasas | 3300 | 2100 | 4500 |

LE90, LE133 y CH116: cepas de *Pycnoporus sanguineus* nativas del estado de Nuevo León

ricos en lignocelulosa (Rohr *et al.*, 2013; Kumla *et al.*, 2020). Cabe mencionar que, esta combinación de lacasa-xilanasas estaría relacionada con la estrategia de descomposición de la lignocelulosa de estas cepas en su sustrato natural (Veloz Villavicencio *et al.*, 2020). Esta combinación es de gran interés en el mejoramiento de las propiedades funcionales de las masas y la calidad final de sus productos (Niño-Medina *et al.*, 2017). Con respecto a la combinación de α -amilasa, xilanasas y celulasas se ha demostrado su efecto sinérgico sobre las propiedades reológicas de la masa al reducir la absorción del agua y, por ende, en la extensibilidad, ablandamiento y el índice de tolerancia de mezclado de éstas (Liu *et al.*, 2017). Sin embargo, estas enzimas aplicadas fueron obtenidas de diferentes casas comerciales. Por lo que, la obtención de concentrados enzimáticos a partir de un mismo organismo, creciendo en un medio de producción de bajo costo (como los residuos agroindustriales), de fácil recuperación y con las ventajas de termoestabilidad y rangos amplios de pH, son algunos de los atributos que podrían hacer de estas cepas de *Pycnoporus sanguineus* excelentes candidatos para su aplicación a nivel industrial (Okal *et al.*, 2020). Los aislados de este género son considerados organismos robustos, capaces de tolerar condiciones extremas de pH y temperatura. La termoestabilidad reportada en los sistemas lignocelulolíticos de cepas *P. sanguineus* demuestran su potencial aplicación en los procesos biotecnológicos (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015; Orlikowska *et al.*, 2018; Niderhaus *et al.*, 2018). Por tal razón, serán requeridos futuros estudios para la optimización de la producción, así como de la caracterización de las propiedades operativas y funcionales de las enzimas producidas por estos aislados.

CONCLUSIONES

Gracias a la plasticidad metabólica de estos organismos, las enzimas expresadas en esta investigación pueden producirse en las cantidades aquí descritas o el medio puede ser modificado para obtener una en particular. Las cepas *Pycnoporus sanguineus* LE133 y CH116 tienen potencial para producir lacasa, celulasas, xilanasas y amilasas en un medio de bajo costo. Además, el cóctel enzimático de *P. sanguineus* LE133 puede ser aplicado en la industria de la panificación

como mejorador de productos elaborados a base de harina integral.

REFERENCIAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A. y Gübitz, G.M. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Applied and environmental microbiology. 66(8): 3357-3362.
- Álvarez, J., Sánchez, C., Díaz, R. y Díaz-Godínez, G. 2016. Characterization of production of laccases, cellulases and xylanases of *Pleurotus ostreatus* grown on solid-state fermentation using an inert support. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 15(2): 323-331.
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L. y Trejo-Hernández, M.R. 2015. Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 122: 339-347.
- Drozłowska, E. 2019. The use of enzymatic fungal activity in the food industry-review. World Scientific News. 116: 222-229.
- Gauna, A., Larran, A.S., Feldman, S.R., Permingeat, H.R. y Perotti, V. E. 2020. Secretome characterization of the lignocellulose-degrading fungi *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma applanatum*. bioRxiv. Woodbury, NY
- Gómez, M., Gutkoski, L.C. y Bravo-Núñez, Á. 2020. Understanding whole-wheat flour and its effect in breads: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 19(6): 3241-3265.
- Gutiérrez -Soto, G., Medina-González, G.E., García- Zambrano, E.A., Treviño-Ramírez, J. E. y Hernández-Luna, E. 2015. Selection and Characterization of a Native *Pycnoporus sanguineus* Strain as a Lignocellulosic Extract Producer from Submerged Cultures of Various Agroindustrial Wastes. BioResources. 10(2): 3564-3576.
- Kathirgamanathan, M., Abayasekera, C.L., Kulasooriya, S.A., Wanigasekera, A. y Ratnayake, R.R. 2017. Evaluation of 18 isolates of basidiomycetes for lignocellulose degrading enzymes. Ceylon Journal of Science. 46(4): 77-84.
- Khokhar, I., Mukhtar, I. y Mushtaq, S. 2011. Isolation and screening of amyolytic filamentous fungi. Journal of Applied Sciences and Environmental Management. 15(1): 203-206.
- Kobakhidze, A., Asatiani, M., Kachlishvili, E. y Elisashvili, V. 2016. Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. Annals of Agrarian Science. 14(3): 169-176.
- Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhruue, W., Kakumyan, P., Jatuwong, K., Vadthananarat, S. y Lumyong, S. 2020. Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste. Molecules. 25(12): 2811.
- Li, S., Tang, B., Liu, Y., Chen, A., Tang, W. y Wei, S. 2016. High-level production and characterization of laccase from a newly isolated fungus *Trametes* sp. LS-10C. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 8: 278-285.
- Liu, W., Brennan, M. A., Serventi, L. y Brennan, C.S. 2017. Effect of cellulase, xylanase and α -amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. Food chemistry 234: 93-102.

- Medina-González, G.E., H. Bernal Barragán, C.E. Hernández-Luna, C.A. Hernández-Martínez, G. y Gutiérrez-Soto, G. 2016. Uso de basidiomicetos nativos en la biotransformación del pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) para mejorar la calidad nutricional. *Revista Mexicana de Micología*. 43: 31-35.
- Miguel, Â.S.M., Martins-Meyer, T.S., Figueiredo, E.V.D.C., Lobo, B.W.P. y Dellamora-Ortiz, G.M. 2013. Enzymes in bakery: current and future trends. En: *Food industry* (Ed.), pp 278-321. IntechOpen. Inc., Londres.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31(3): 426-428.
- Naidu, Y., Siddiqui, Y. y Idris, A.S. 2020. Comprehensive studies on optimization of ligno-hemicellulolytic enzymes by indigenous white rot hymenomycetes under solid-state cultivation using agro-industrial wastes. *Journal of environmental management*. 259: 110056.
- Niderhaus, C., Garrido, M., Insani, M., Campos, E., y Wirth, S. 2018. Heterologous production and characterization of a thermostable GH10 family endo-xylanase from *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126. *Process Biochemistry*. 67: 92-98.
- Niño-Medina, G., Gutiérrez-Soto, G., Urías-Orona, V. y Hernández-Luna, C.E. 2017. Effect of laccase from *Trametes maxima* CU1 on physicochemical quality of bread. *Cogent Food & Agriculture*. 3(1): 1328762.
- Okal, E.J., Aslam, M.M., Karanja, J.K. y Nyimbo, W.J. 2020. Mini review: Advances in understanding regulation of cellulase enzyme in white-rot basidiomycetes. *Microbial Pathogenesis*. 147: 104410.
- Orlikowska, M., Rostro-Alanis, M.D.J., Bujacz, A., Hernández-Luna, C., Rubio, R., Parra, R. y Bujacz, G. 2018. Structural studies of two thermostable laccases from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. *International journal of biological macromolecules*. 107: 1629-1640.
- Patel, A.K., Singhania, R.R. y Pandey, A. 2016. Novel enzymatic processes applied to the food industry. *Current Opinion in Food Science*. 7: 64-72.
- Patel, A.K., Singhania, R.R., y Pandey, A. 2017. Production, purification, and application of microbial enzymes. En: *Biotechnology of Microbial Enzymes* (ed.), pp. 13-41. Academic Press. Inc., Cambridge.
- Pezzella, C., Lettera, V., Piscitelli, A., Giardina, P. y Sannia, G. 2012. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(2): 705-717.
- Pozdnyakova, N.N., Turkovskaya, O.V., Yudina, E.N. y Rodakiewicz-Nowak, Y. 2006. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: purification and characterization. *Applied Biochemistry and microbiology*. 42(1): 56-61.
- Ramírez-Cavazos, L. I., Junghanns, C., Ornelas-Soto, N., Cárdenas-Chávez, D.L., Hernández-Luna, C., Demarche, P., Enaud, E., García-Morales, R., Agathos, S.N. y Parra, R. 2014. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 108: 32-42.
- Riegas-Villalobos, A., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón, L., Bertrand, B. y Trejo-Hernández, M.R. 2020. Efficient removal of azo-dye Orange II by fungal biomass absorption and laccase enzymatic treatment. *3 Biotech*. 10(4): 1-10.
- Rohr, C.O., Levin, L.N., Mentaberry, A.N. y Wirth, S.A. 2013. A first insight into *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126 transcriptome. *PLoS one*. 8(12): e81033.
- Salazar-López, M., Rostro-Alanis, M.D.J., Castillo-Zacarias, C., Parra-Guardado, A.L., Hernández-Luna, C., Iqbal, H.M. y Parra-Saldivar, R. 2017. Induced degradation of anthraquinone-based dye by laccase produced from *Pycnoporus sanguineus* (CS43). *Water, Air, & Soil Pollution*. 228(12): 1-10.
- Sin, M.K., Hyde, K.D. y Pointing, S.B. 2002. Comparative enzyme production by fungi from diverse lignocellulosic substrates. *Journal of Microbiology*. 40(3): 241-244.
- Singh, P. y Kumar, S. 2019. Microbial enzyme in food biotechnology. En: *Enzymes in Food Biotechnology* (ed.), pp 19-28. Academic Press. Inc., Cambridge.
- Singh, R., Singh, A. y Sachan, S. 2019. Enzymes used in the food industry: Friends or foes? En: *Enzymes in food biotechnology* (ed.), pp 827-843. Academic Press. Inc., Cambridge.
- Tebben, L., Shen, Y. y Li, Y. 2018. Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science & Technology*. 81: 10-24.
- Valadares, F., Gonçalves, T.A., Damasio, A., Milagres, A.M., Squina, F.M., Segato, F. y Ferraz, A. 2019. The secretome of two representative lignocellulose-decay basidiomycetes growing on sugarcane bagasse solid-state cultures. *Enzyme and microbial technology*. 130: 109370.
- Veloz Villavicencio, E., Mali, T., Mattila, H.K., y Lundell, T. 2020. Enzyme activity profiles produced on wood and straw by four fungi of different decay strategies. *Microorganisms*. 8(1): 73.
- Vrsanska, M., Voberkova, S., Langer, V., Palovcikova, D., Moulick, A., Adam, V. y Kopel, P. 2016. Induction of Laccase, Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase Activities in White-Rot Fungi Using Copper Complexes. *Molecules*. 21(11): 1553.
- Wang, W., Liu, F., Jiang, Y., Wu, G., Guo, L., Chen, R., Chen, B., Lu, Y., Dai, Y. y Xie, B. 2015. The multigene family of fungal laccases and their expression in the white rot basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Gene*. 563(2): 142-149.
- Zhang, Y., He, S. y Simpson, B.K. 2018. Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science*. 19: 30-35.
- Zhuo, R., Yuan, P., Yang, Y., Zhang, S., Ma, F. y Zhang, X. 2017. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochemical Engineering Journal*. 117: 62-72.
- Zimbardi, A., Camargo, P., Carli, S., Aquino Neto, S., Meleiro, L., Rosa, J., Andrade, A., Jorge, J. y Furriel, R. 2016. A High Redox Potential Laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential Application for Dye Decolorization. *International Journal of Molecular Science*. 17(5): 672.

Evaluation of the antioxidant interaction between butylated hydroxytoluene and quercetin and their utility for beef patties preservation

Evaluación de la interacción antioxidante de hidroxitolueno butilado y quercetina y su utilidad para la preservación de hamburguesas de carne de res

Flavio Martinez-Morales^a, Juan Ramon Zapata-Morales^b, Othoniel Hugo Aragon-Martinez^{a,c,*}

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Avenida Venustiano Carranza 2405, Colonia Los Filtros, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78210, México.

^b Departamento de Farmacia, Division de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n, Colonia Noria Alta, Guanajuato, Gto., C.P. 36050, Mexico.

^c LABCON Laboratorio de Compuestos Naturales, Don Alejo 436, Colonia Don Antonio, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78414, México.

ABSTRACT

The present study aimed to find a mixture of butylated hydroxytoluene (BHT) and quercetin with an antioxidant synergism that would enable the use at low concentrations of both compounds and, subsequently, evaluate the preservative action of the combination selected on ground beef patties stored at 4 °C. Our results showed that quercetin possessed higher antioxidant activity than BHT, and of the five combinations tested, the 1:5 BHT-quercetin combination presented a synergistic antioxidant activity. For the refrigerated beef patties, the 1:5 combination (5.2 and 26.0 mg/kg of BHT and quercetin, respectively) produced a beneficial action on the redness, yellowness, antioxidant capacity, metmyoglobin content, and thiobarbituric acid reactive substance value, which was similar to that produced by 100 or 36 mg/kg of BHT or quercetin ($P > 0.05$, except the redness induced by quercetin). These benefits were compared with the data obtained from a preservative-free patty control sample ($P < 0.001$ to < 0.05). Our study shows, for the first time, that the use of a 1:5 BHT-quercetin combination was an effective, simple, and available method to preserve refrigerated beef patties, which can substitute the individual addition of high concentrations of these compounds by the meat industry.

Keyword: antioxidant activity; synergism; ground beef; color degradation; protein oxidation.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo encontrar una mezcla de BHT y quercetina con un sinergismo antioxidante que permitiera usar a ambos compuestos a concentraciones bajas para posteriormente, evaluar la acción preservante de la combinación seleccionada en hamburguesas de carne de res almacenadas a 4 °C. Nuestros resultados mostraron que quercetina tuvo mayor actividad antioxidante que BHT y de las cinco combinaciones evaluadas, la combinación 1:5 de BHT y quercetina presentó una actividad antioxidante mayor. Por lo tanto, esta misma combinación 1:5 a una dosis de 5.2 y 26 mg/kg de BHT y quercetina fue empleada para las ham-

burguesas de carne, donde ésta produjo una acción benéfica en la abundancia del color rojo y amarillo y en la capacidad antioxidante y una reducción de metamioglobina y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, semejante al producido por 100 o 36 mg/kg de BHT o quercetina, en comparación a los valores observados en las hamburguesas sin conservadores (testigo). Con este estudio se muestra por primera vez que, el uso de una combinación 1:5 de BHT-quercetina es un método efectivo, sencillo y asequible para preservar hamburguesas de carne, lo cual podrá sustituir la adición individual de altas concentraciones de estos compuestos por la industria cárnica.

Palabras clave: actividad antioxidante; sinergismo; carne de res molida; degradación del color; oxidación proteica.

INTRODUCTION

For decades, beef has played a crucial role in human diet as an important source of proteins, minerals, vitamins, and other nutrients vital for human health. As ground beef constitutes 64 % of all meat consumed by humans, extending the shelf-life of this product is a major challenge for the meat industry (Ouerfelli *et al.*, 2019; Weinroth *et al.*, 2019). In this regard, a shelf-life of approximately ten days at refrigerated temperatures can enable a meat product to be distributed to retail outlets (Kapetanakou *et al.*, 2020). Meat and meat products are susceptible to microbial growth, discoloration, and processes of protein and lipid oxidation (Ouerfelli *et al.*, 2019; Kapetanakou *et al.*, 2020). Currently, one of the methods applied to preserve meat and meat products is the use of additives with antioxidant properties such as butylated hydroxytoluene (BHT) (Ouerfelli *et al.*, 2019).

Recognized as safe for use in food under United States regulations, BHT, a synthetic phenolic compound, is included in the Title 21 of the Code of Federal Regulations and the Food Additive Status List of the US Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2019; Electronic Code of Federal Regulations, 2021). In this way, BHT can be added singly or in combination with other synthetic phenolic antioxidants to

*Autor para correspondencia: Othoniel Hugo Aragon-Martinez
Correo electrónico: hugo.aragon@uaslp.mx

Recibido: 08 de agosto de 2021

Aceptado: 16 de octubre de 2021

fat, oils, and meat, at a concentration of 100 mg/kg (Cantú-Valdéz *et al.*, 2020; Liu and Mabury, 2020). Nevertheless, due to their ubiquity, BHT possess several human exposure pathways, including the food intake, indoor dust ingestion, and use of personal care products (Liu and Mabury, 2020). Timing and dose exposure are important factors modulating the potentially deleterious effects of BHT use (Wang and Kannan, 2019). For example, a consumption of 1.35-5 % or 0.05-0.5 % BHT over 30 days or 10 months caused a toxic nephrosis or development of liver tumors in mice (Liu and Mabury, 2020).

In order to reduce the use of synthetic additives, preservatives obtained from natural sources have been developed to ensure safety, encourage customer acceptance, and expand shelf-life for meat products (Mtibaa *et al.*, 2019; Zahid *et al.*, 2019). Although several natural preservatives have been reported in the literature, BHT continues to be used extensively by the food and cosmetic industry (Liu and Mabury, 2020). One potential natural preservative is quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), which is a flavonoid found in apples, green beans, broccoli, tomatoes, onions, Ginkgo biloba, and milk thistle, among others (Bekhit *et al.*, 2003; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012; Andres *et al.*, 2018). A typical western diet provides an estimated daily quercetin intake of 4 to 40 mg (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012). There are numerous reports on the biological effects of this flavonoid, based on both *in vitro* experiments and animal studies including humans. The results of these studies reveal that quercetin has antioxidant, anti-inflammatory, immunoprotective, anticarcinogenic, and ergogenic effects (Andres *et al.*, 2018). Currently, quercetin is marketed as an ingredient in various dietary supplements, is generally well-tolerated, and is free of discernible adverse events (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012; Andres *et al.*, 2018). Quercetin is recognized as safe by the FDA, with additional mean intakes of 200 or 400 mg/day estimated for all ages or high-intake consumers, respectively (Andres *et al.*, 2018). Although quercetin is a compound obtained from natural sources, some studies show that high doses may cause enhanced nephrotoxic effects in pre-damaged kidneys, and may promote the growth of already existing cancer cells (Andres *et al.*, 2018).

The use of low concentrations of additives recognized as safe under a certain limit, is desirable to avoid adverse health effects by an accumulative exposure but maintaining their preservative effects on meat products. On the other hand, combination studies are common methods for identifying synergy among drugs, a phenomenon which can facilitate the reduction of dosages while maintaining superior or similar therapeutic efficacy to that obtained from drugs when administered individually and, moreover, a lower incidence of adverse events than that obtained from individual use (Chou, 2006; Zapata-Morales *et al.*, 2021). To our knowledge, a combination approach has never been applied to preservatives added to meat products. Therefore, the present study

aimed to identify the BHT-quercetin mixture with a synergic antioxidant action and, subsequently, evaluate its utility against degraded antioxidant capacity, color degradation, and protein and lipid oxidation in refrigerated beef patties to which either the selected BHT-quercetin combination, BHT or quercetin alone had been added.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Quercetin, BHT, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), dimethyl sulfoxide (DMSO), thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, hydrochloric acid, and 1,1,3,3-tetraethoxypropane used in the present study were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A food grade Spanish extra virgin olive oil (EVO) was used (Kuali® trademark, Monterrey, NL, Mexico), while methanol and ethanol were of liquid chromatography and spectrophotometry grade (Mallinckrodt Baker Inc., Mexico City, Mexico). Deionized water (MontRial, San Luis Potosi, Mexico) was used for aqueous solutions.

DPPH radical scavenging assay

A stock solution of 920 µmol/L DPPH radical was prepared in methanol, with stock solutions of 600 µg/mL quercetin and 1400 µg/mL BHT prepared in ethanol-DMSO (96:4 v/v). Subsequently, working standards for the quercetin were established between 3 and 600 µg/mL and for the BHT between 7 and 1400 µg/mL using ethanol-DMSO (96:4 v/v), while a 460 µmol/L DPPH radical solution was prepared from the stock solution of DPPH radical and methanol. For each preparation tested, the number of standards and the range of concentrations were prepared in accordance with the guidelines for an accurate IC₅₀ estimation (Sebaugh, 2011). The antioxidant assay involved the addition of fifty microliters of sample (quercetin, BHT, or solvent) to a tube containing 200 µL of DPPH radical solution (0 or 460 µmol/L), incubated at 30 °C for 20 min. Once the incubation had been completed, 150 µL of each mixture was placed in a vial insert (part number 5181-1270, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) which was kept under constant lighting at a fixed distance to a mobile phone with an integrated eight-megapixel camera (Moto e5 play, Motorola Mobility LCC, IL, USA).

The Red Green Blue (RGB) color response and reflectance spectrum were monitored for each sample, using a colorimeter application (Colorimeter version 5.5.1, Research Lab Tools, Sao Paulo, Brazil, purchased from Google Play) installed on the mobile phone. For each experimental sample, a ΔRG value was calculated by subtracting the experimental value (sample plus 460 µmol/L DPPH radical) from a blank value (sample plus 0 µmol/L DPPH radical) with a percentage of the ΔRG value then obtained using the following equation (Ravindranath *et al.*, 2018):

$$\Delta RG(\%) = \left(\frac{\Delta RG}{255} \right) \times 100$$

Subsequently, the DPPH radical inhibition percentage was calculated using the ΔRG (%) values obtained from both a second blank value (sample solvent plus 460 µmol/L DPPH

radical) and the experimental sample. Finally, the concentration that achieved 50 % DPPH inhibition (IC_{50}) was calculated for each compound tested, using GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). The antioxidant assay conducted in the present study was following the recommendations for the colorimetric quantifications on smartphones, which are rapid, simple, sensitive, low cost, and reliable analytical techniques (Ravindranath *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2021).

It should be noted that we were unable to find, in the literature, a DPPH radical scavenging assay that uses the approach set out in the present technique. Consequently, before the colorimetric assay was applied on the experimental samples, the assay was validated in accordance with FDA guidelines (US Department of Health and Human Services *et al.*, 2018), with quercetin used as a reference standard, given that it corresponded to a new assay based on a previous spectrophotometric methodology (Martinez-Morales *et al.*, 2020). Blank, lower limit of quantification, and between-day evaluations were performed over three consecutive days. In order to determine the stability percentage for each quality control sample, we compared the experimental value with that obtained immediately after preparation. Finally, the low, middle, and high-quality control samples presented concentrations of 23, 60, and 110 µg/mL quercetin, respectively.

Antioxidant interaction assessment

The experimental design for the constant ratio combinations followed was set out previously (Chou, 2006; Chou, 2010). Once the IC_{50} value of each compound was obtained via the DPPH radical scavenging assay, the BHT and quercetin (BQ) combination was assessed via the same assay using five different proportions (3:1, 1:1, 1:3, 1:5, and 1:10). The data for the individual compounds and combinations were evaluated using both the Chou-Talalay method, which is based on the median-effect equation, which, in turn, is derived from the mass-action law principle (Chou, 2006), and the isobole method described by Tallarida (2002).

The Chou-Talalay theory involves the quantitative definition of synergism, additivity, and antagonism by means of a combination index (CI) value and their visual definition by means of an isobologram (Chou, 2006). In the present study, a weighted average (wa) CI value was calculated for each combination using the following formula:

$$waCI = \frac{CI_{90} + (2 \times CI_{75}) + (3 \times CI_{50}) + (4 \times CI_{30})}{10}$$

The aim of this formula was to increase the relevance of low effect levels, as the preservatives are used at low concentrations in foodstuffs (Chou, 2006; USFDA, 2019; Checkmahomed *et al.*, 2020; Electronic Code of Federal Regulations, 2021). Therefore, a waCI value of < 0.1, 0.1-0.3, 0.3-0.7, 0.7-0.85, 0.85-0.90, 0.90-1.10, 1.10-1.20, 1.20-1.45, 1.45-3.3, 3.3-10, and > 10 indicated a very strong synergism, strong synergism, synergism, moderate synergism, slight synergism, nearly additive, slight antagonism, moderate antagonism, antagonism, strong antagonism, and very strong antagonism, respectively (Chou, 2006). If the data points fell

on the hypotenuse of the isobologram, an additive effect was determined, while, if data points fell on the lower or upper left of the hypotenuse, a synergism or antagonism was determined, respectively (Chou, 2006).

The isobole method involved the calculation of theoretical and experimental IC_{50} values (Zadd and Zexp) for each combination, values used to calculate an interaction index (γ) and to undertake a statistical comparison, where both procedures defined the type of interaction (Alonso-Castro *et al.*, 2017) as described in the section of data analysis.

Preparation of beef patties

After all the experiments described above were completed and analyzed, the utility of the compounds and their combination in the food preservation started. In this way, the meat preparation was as described previously (Gallego *et al.*, 2015; Cantú-Valdéz *et al.*, 2020). In brief, fresh beef pulp, purchased from a local supermarket, was immediately transported to the laboratory and ground in a meat grinder fitted with a 4.5-mm grind plate (Tartare, Metaltext International, Molsheim Cedex, France). Five formulations were prepared: C (meat without additive); V (meat with 20 mL/kg EVO added); B (meat with 100 mg/kg BHT added); Q (meat supplemented with 36 mg/kg quercetin); and, BQ (meat with 5.2 mg/kg of BHT and 26.0 mg/kg of quercetin added, giving a 1:5 ratio).

Prior to meat supplementation, quercetin, BHT, and combination, were dissolved in EVO (20 mL/kg of meat), with the ingredients then mixed manually in a steel bowl for 2 min. Subsequently, each preparation was mixed at low speed for 2 min in a mixer (Model 64650, Hamilton Beach Brands, Inc, VA, USA) and then a 23 g portion of each meat sample was made into a 7-cm in diameter and 1-cm in height burger. Beef patties were placed in a polyethylene bag and stored in a refrigerator at 4 °C under absence of light. Finally, the samples were analyzed for color, antioxidant capacity, metmyoglobin (MetMb) content, and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) value on day 0 (meat samples without addition of preservatives), 1, and 10. It is important to note that the recommended BHT concentration for meat products was used (Cantú-Valdéz *et al.*, 2020), while the concentrations for both quercetin and selected BQ combination were determined on the basis of their antioxidant IC_{50} values and interaction studies, where the used concentrations presented the same antioxidant activity found in the selected BHT concentration. In addition, the volume of the vehicle (EVO) was selected based on the quantity of oily substances used for preservative proposes in ground beef (Cantú-Valdéz *et al.*, 2020).

Color evaluation

The evaluation of beef patties color was as described by Gallego *et al.* (2015). At four different points, a colorimeter (Color Muse, Variable Inc., TN, USA) was directly placed on the surface of the beef patty in areas without fat or connective tissue. For each point, the L^* , a^* , and b^* values pertaining to the CIE Lab color system were recorded to measure lightness,

redness, and yellowness, respectively. Prior to the measurements recording, the calibration of the colorimeter was using a standard white plate provided, along with the instrument, by the manufacturer. The mean value for each CIE Lab parameter was calculated for each sample.

Antioxidant capacity

A beef patty sample (0.20 to 0.58 g) was placed in a tube containing 500 μ L ethanol-DMSO (96:4 v/v), mixed for 1 min, and centrifuged at 1500 xg for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. Subsequently, the supernatant (50 μ L) was processed using the DPPH radical scavenging assay as described in the section above. For these measurements, the data was expressed as the percentage radical inhibition/200 mg of meat. For some samples, a weight of > 200 mg was necessary in order to obtain a response within the analytical range of the assay. As the methodology for the radical inhibition assay had been slightly modified for these samples, a partial validation was also performed (data not shown) in accordance with FDA guidelines (US Department of Health and Human Services *et al.*, 2018).

Metmyoglobin (MetMb) content

The quantification of MetMb was according to Mtibaa *et al.* (2019). Briefly, 0.2 g of beef patty was placed in a tube containing 1 mL of cold phosphate buffer solution (40 mM at pH 6.8) and mixed for 1 min, the mixture kept at 4 $^{\circ}$ C for 1 h and centrifuged at 4500 xg for 30 min at 4 $^{\circ}$ C. Each sample supernatant was filtered through a 0.45- μ m-pore-size filter unit (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), after which 200 μ L of the filtrate was placed into one well of a 96-well plate (Costar[®] 3595, Corning Incorporated, NY, USA). The absorbance was recorded at 572, 565, 545, and 525 nm using a Cytation[™] 3 microplate reader and Gen5[™] software (Biotek Instruments Inc., Vermont, USA). For each sample, the MetMb percentage determination was using the following formula (Mtibaa *et al.*, 2019):

$$\text{MetMb (\%)} = \left[\left(-2.51 \times \frac{A_{572}}{A_{525}} \right) + \left(0.777 \times \frac{A_{565}}{A_{525}} \right) + \left(0.8 \times \frac{A_{545}}{A_{525}} \right) + 1.098 \right] \times 100$$

In the formula, the term A alongside a number denotes the absorbance and wavelength.

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) value

The determination of TBARS was according to Eymard *et al.* (2005) and Mtibaa *et al.* (2019). A sample of the ground beef patty (0.12 to 0.18 g) was placed in a tube containing 1 mL of 50 g/L trichloroacetic acid and 6 μ L of 1 g/L BHT and then mixed for 1 min. The mixture was centrifuged at 1900 xg for 10 min at 18 $^{\circ}$ C, with the supernatant (250 μ L) then added to 150 μ L of 0.8 % thiobarbituric acid. This second mixture was incubated at 75 $^{\circ}$ C for 30 min and kept at 4 $^{\circ}$ C for 3 min. Two hundred microliters of each mixture were placed in one well of a 96-well plate (Costar[®] 3595, Corning Incorporated, NY, USA). The absorbance was read at 532 nm using the Cytation[™] 3 microplate reader and Gen5[™] software (Biotek Instruments Inc., Vermont, USA). The TBARS value

was calculated using a calibration curve of malondialdehyde with a 239 μ g/mL malondialdehyde stock solution and the results were expressed as μ g TBARS/g of meat. For this assay, the malondialdehyde was obtained from the degradation of 1,1,3,3-tetraethoxypropane, which was induced by their exposition to 0.1 N hydrochloric acid under a boiling water bath.

Data analysis

The antioxidant IC₅₀ values of the BHT and quercetin were analyzed using an unpaired t test, using the GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). For the combination analyses using the Chou Talalay theory, the conformity of the data with the mass-action law was evaluated using the linear correlation coefficient (r) of the median effect plot, where an r value > 0.95 was considered an acceptable conformity (Chou, 2006). All these analyses and isobolograms were performed using the Compusyn software (Chou and Martin, 2005). Data with effects of \geq 1.0 were not included in the analyses because the Compusyn software cannot compute values with this level.

For the isobole method, the statistical comparison of the Zadd and Zexp values alongside the γ index defined the interaction as a synergism (γ index < 1.0 and P < 0.05), additivity (γ index close to 1.0 and P > 0.05), or antagonism (γ index > 1.0 and P < 0.05) (Alonso-Castro *et al.*, 2017). These statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA).

The presentation of color, antioxidant capacity, MetMb, and TBARS data are as both the mean and standard deviation. The analysis of C, V, B, Q, and BQ group values were using a two-way ANOVA with a Bonferroni post-test, using the GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). For all the statistical analyses, a P value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant activity

Calculated via the GraphPad or Compusyn software, the respective antioxidant IC₅₀ values for quercetin and BHT were 89.7 \pm 4.3 and 171.7 \pm 8.2 μ g/mL (nine points per curve, N= 5) or 50.2 and 139.4 μ g/mL (eight points per curve, N= 5), respectively. Our evaluations showed that quercetin presents a higher antioxidant activity level than BHT (P < 0.0001), a finding also observed in previous individual evaluations of the action of both compounds against the DPPH radical (Popovic-Milenkovic *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2018). However, the IC₅₀ values obtained in the present study were higher than those reported previously (Popovic-Milenkovic *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2018), a difference due to some technical conditions, such as a lower DPPH concentration, different reaction medium, and the absence of a validation procedure for the antioxidant assay (Martinez-Morales *et al.*, 2020), unlike that used in our study. Given the use of a new antioxidant assay, Table 1 shows the results obtained from the analytical validation, which measured the quercetin antioxi-

Table 1. Complete validation of the DPPH radical inhibition (%) assay with quercetin**Table 1.** Validación completa del ensayo de la inhibición del radical DPPH con quercetina

| Parameter | Value |
|---|--------------------------------------|
| Calibration curve (N= 6) | |
| Range (µg/mL quercetin) | 12-125 |
| Calibration model | Second order polynomial relationship |
| R ² value | 0.9954 ± 0.0032 |
| Accuracy (%) of calibrators | 99.0 ± 8.2 |
| LLOQ (12 µg/mL, N= 6) | |
| Accuracy (%) | 98.3 ± 16.4 |
| Precision (%CV) | 16.7 |
| Blank sample (0 µg/mL quercetin plus 450 µmol/L DPPH radical, N= 6) | |
| Accuracy (%) | The value is not calculable |
| Precision (%CV) of the ΔRG (%) values | 11.5 |
| Accuracy of QC samples (% , N= 6) | |
| Within day evaluation | |
| Low QC | 92.8 ± 12.3 |
| Middle QC | 88.7 ± 2.9 |
| High QC | 102.3 ± 3.7 |
| Between day evaluation | |
| Low QC | 95.7 ± 10.3 |
| Middle QC | 89.7 ± 4.0 |
| High QC | 99.7 ± 4.9 |
| Precision of QC samples (%CV, N= 6) | |
| Within day evaluation | |
| Low QC | 13.4 |
| Middle QC | 3.6 |
| High QC | 3.6 |
| Between day evaluation | |
| Low QC | 14.2 |
| Middle QC | 6.1 |
| High QC | 4.7 |
| Stability of QC samples under different conditions (% , N= 5) | |
| At room temperature (45 min) | |
| Low QC | 97.3 ± 2.5 |
| High QC | 89.0 ± 3.7 |
| On the vial insert (15 min) | |
| Low QC | 97.6 ± 1.7 |
| High QC | 95.5 ± 7.8 |
| Storage at -18 °C (24 h) | |
| Low QC | 87.2 ± 0.8 |
| High QC | 53.4 ± 4.1 |

Each value is the mean ± standard deviation or percentage of coefficient of variation (%CV). DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl; LLOQ: lower limit of quantification; QC: quality control.

dant activity against the DPPH radical. In order to complete the validation process, we carried out identification tests with the reflectance spectra of the samples, modifying the spectra record by means of a color change (Figure 1). All the validation and identification tests results were within the acceptability criteria stipulated by the FDA and International Conference on Harmonization (ICH) guidelines (ICH, 2005; US Department of Health and Human Services *et al.*, 2018), except the stability results for the high QC samples stored at -18 °C for 24 h. For this reason, the preparation of stock, standard solutions and experimental samples were on the same day they of the assays. For quantitative determinations, the application of the guidelines described by the FDA and ICH guarantees the reliability and strict control on the results, as well as the suitability, accuracy, and reproducibility of the assay (Gonzalez-Rivera *et al.*, 2019).

Antioxidant interaction outcomes

To our knowledge, there are no previous reports presenting an evaluation of the antioxidant interactions between BHT and quercetin. The antioxidant IC₅₀ values for the 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, and 1:10 BQ combinations were 97.1, 83.4, 63.1, 43.7, and 50.2 µg/mL, respectively (six points per curve, N= 5). Table 2 and Figure 2 show the data and isobolograms

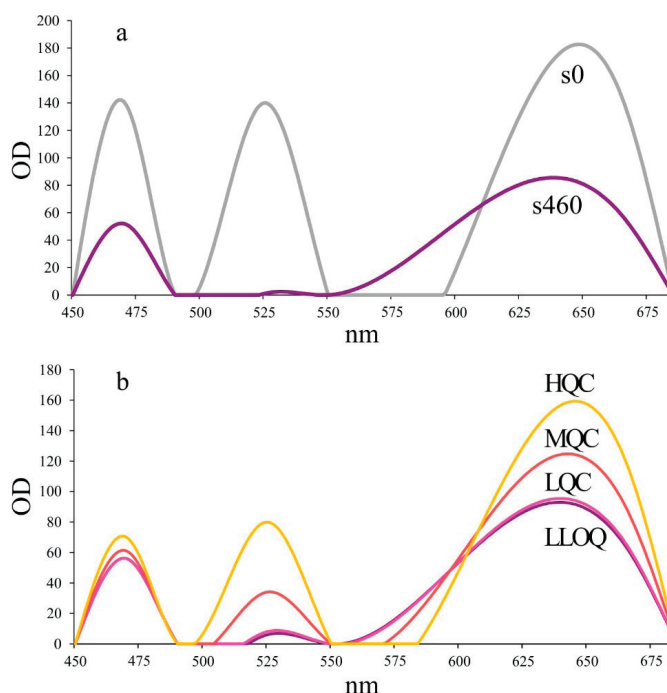


Figure 1. Representative reflectance spectra for the two blank samples (a): sample solvent plus 0 µmol/L DPPH radical (s0) and sample solvent plus 460 µmol/L DPPH radical (s460). Furthermore, the spectra records for the LLOQ and lower (L), middle (M) and high (H) QC samples are shown (b). DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl; LLOQ: lower limit of quantification; QC: quality control.

Figura 1. Espectros de reflectancia representativos para las dos muestras de blancos (a): solvente de la muestra más radical DPPH 0 µmol/L (s0) y solvente de la muestra más radical DPPH 460 µmol/L (s460). Además, los registros de los espectros para el LLOQ y QC bajo (L), medio (M) y alto (H) son mostrados (b). DPPH: 2,2'-difeníl-1-picrílhidrazilo; LLOQ: límite más bajo de cuantificación; QC: control de calidad.

obtained from the interaction experiments conducted on the compounds. Our experiments revealed that the 1:5 BQ combination was the only combination that produced a synergistic interaction at the three levels of effects (30, 50, and 90 %). This interaction was determined using the Chou-Talalay and isobole methods, as well as a moderate level of synergy established by the Chou-Talalay theory. Consequently, we used this ratio for the utility evaluation of the BQ combination for beef patties preservation. On the other hand, the 3:1, 1:1, 1:3, and 1:10 BQ combinations presented, respectively, a nearly additive, slight antagonistic, nearly additive, and nearly additive effect, according to the Chou-Talalay method, while an antagonistic, additive, additive, and additive effect presented for the same combinations, respectively, according to the isobole method (Table 2 and Figure 2). To confirm our results, we used a second recognized methodology, such as the isobole method, since an unacceptable conformity of the data with the mass-action law was evident in the majority of the combinations when applying the Chou-Talalay approach, with the interpretation of both methods showing minor discrepancies.

Shelf-life of beef patties

Before discussing the effects of the combination selected on food evaluations, it is important to note that the 1:5 BQ combination contains much lower amounts of BHT and quercetin than the individual concentration of each compound, due to the synergism found in this combination. The meat quality parameters evaluated in beef patties at day

Tabla 2. Evaluación de las interacciones antioxidantes entre BHT y quercetina (BQ).

Table 2. Evaluation of the antioxidant interactions between BHT and quercetin (BQ).

| Sample | Chou-Talalay method | | Isobole method | | | |
|---------|---------------------|---------|----------------|--------------|---------|---------|
| | waCl | r value | Zadd (µg/mL) | Zexp (µg/mL) | γ value | P value |
| BQ 3:1 | 1.001 | 0.9361 | 111.5 ± 2.4 | 122.0 ± 6.3 | 1.091 | 0.0081 |
| BQ 1:1 | 1.125 | 0.9479 | 90.9 ± 3.8 | 95.2 ± 2.8 | 1.045 | 0.0761 |
| BQ 1:3 | 1.051 | 0.9555 | 76.9 ± 4.6 | 73.9 ± 4.0 | 0.959 | 0.3064 |
| BQ 1:5 | 0.774 | 0.9007 | 73.1 ± 4.8 | 64.0 ± 3.2 | 0.874 | 0.0075 |
| BQ 1:10 | 0.936 | 0.9032 | 69.9 ± 4.9 | 70.4 ± 2.0 | 1.006 | 0.8571 |

For the Chou-Talalay or isobole method, BHT and quercetin concentrations ranged from 7.6 to 967.2 and 3.1 to 397.8 µg/mL (eight points per compound, N= 5) or from 7.6 to 1488.0 and 3.1 to 612.0 µg/mL (nine points per compound, N= 5), respectively. For both methods, a range of concentrations from 14.8 to 472.8, 8.3 to 267.0, 7.9 to 252.4, 6.7 to 215.6, and 6.1 to 196.7 µg/mL were used for the 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, and 1:10 combinations (six points per combination, N= 5), respectively. For each comparison between the Zadd and Zexp value, their P value is shown in the latest column of the table. γ: interaction index; BHT: butylated hydroxytoluene; waCl: weighted average combination index.

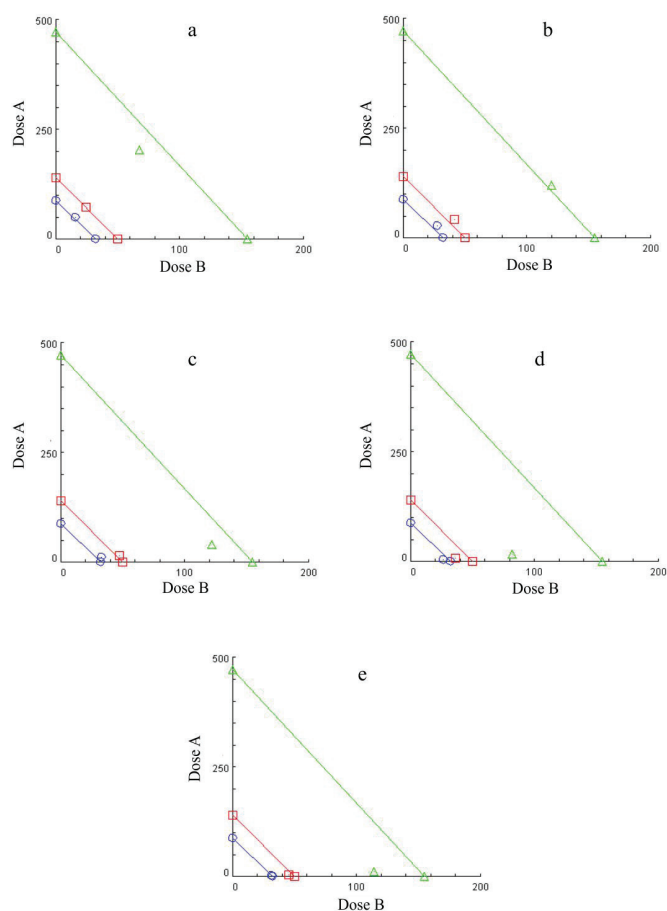


Figure 2. Isobolograms for the 30 % (blue), 50 % (red), and 90 % (green) free radical inhibition induced by the butylated hydroxytoluene and quercetin combination at 3:1 (a), 1:1 (b), 1:3 (c), 1:5 (d), and 1:10 (e). A: butylated hydroxytoluene; B: quercetin.

Figura 2. Isobogramas para el 30 % (azul), 50 % (rojo) y 90 % (verde) de inhibición del radical libre inducido por la combinación de hidroxitolueno butilado y quercetina 3:1 (a), 1:1 (b), 1:3 (c), 1:5 (d) y 1:10 (e). A: hidroxitolueno butilado; B: quercetina.

0 and 1 did not show significant changes between them ($P > 0.05$, Figure 3 and 4). Meanwhile, a decay of the parameters in beef patties was observed at day 10, in comparison with the data obtained at day 0 and 1 ($P < 0.05$, Figure 3 and 4), which was produced by the quality deterioration in meat products during their storage (Mtibaa *et al.*, 2019). For the present experiments, the period of refrigeration was close to the shelf-life required to distribute the meat products to retail outlets (Kapetanakou *et al.*, 2020). However, three parameters did not show a significant deterioration through the time as described in detail below.

Color improvement

The lightness, redness, and yellowness of the meat decrease as refrigeration time continues (Gallego *et al.*, 2015). While after ten days of storage at 4 °C, the lightness of the beef patty showed no modification by any supplementation ($P > 0.05$ for all groups at any time, N= 7, Figure 3a), the redness and yellowness of the meat added with the BHT, quercetin, or BQ combination was more intensive than that

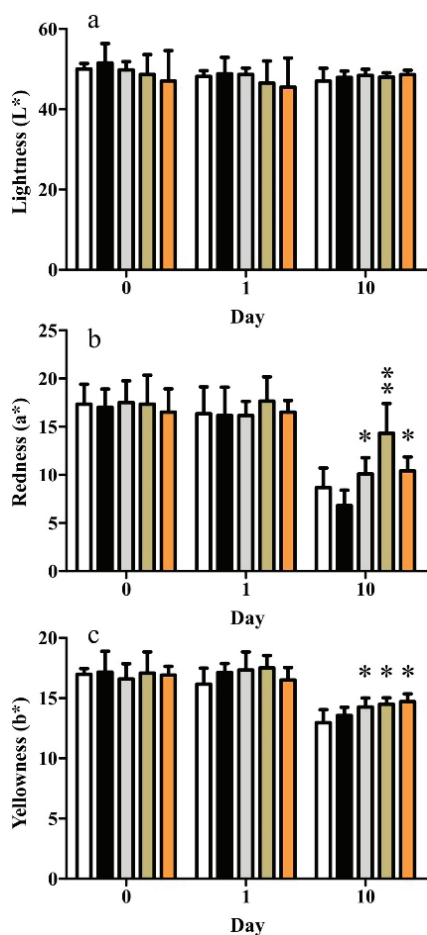


Figure 3. Lightness (a), redness (b), and yellowness (c) of the following groups studied: non-added meat (white bar) or added with the vehicle (black bar), butylated hydroxytoluene (gray bar), quercetin (brown bar), or combination (orange bar). *P value of < 0.05 versus V for redness and < 0.05 versus C for yellowness. **P value of < 0.001 versus C and V, and < 0.05 versus B and BQ.

Figura 3. Luminosidad (a) y abundancia del color rojo (b) y amarillo (c) de los siguientes grupos estudiados: carne no adicionada (barra blanca) o adicionada con el vehículo (barra negra), hidroxitolueno butilado (barra gris), quercetina (barra café) o combinación (barra anaranjada). *Valor de P de < 0.05 versus V para abundancia del color rojo y < 0.05 versus C para abundancia del color amarillo. **Valor de P de < 0.001 versus C y V, y < 0.05 versus B y BQ.

found in the non-supplemented patty or that treated with vehicle alone (N= 7, Figure 3b and c). Moreover, the quercetin produced more intense redness than the other supplements and prevented the deterioration in redness through time (P > 0.05 for Q groups on day 0, 1, and 10).

Redness is the most important color parameter for the evaluation of meat oxidation and a key predictor for the acceptability of a meat product to consumers (Gallego *et al.*, 2015). In line with our data, information presented by previous studies shows that BHT added to meat is capable of producing either higher L*, a*, and b* values, or solely higher a* values, than those observed in non-supplemented ground beef, when stored at 4 °C for seven or eight days (Kim *et al.*, 2013; Cantú-Valdéz *et al.*, 2020). Similarly, quercetin is able to produce improved redness and yellowness in beef patties,

unlike those made from non-supplemented meat, when stored at 2 °C for nine days (Bekhit *et al.*, 2003).

Antioxidant ability and inhibition of the protein and lipid oxidation

The meat added with the individual or combined compounds, showed a significant antioxidant capacity and lower MetMb and TBARS content than those values obtained from the non-supplemented meats, or those treated with vehicle solely after ten days of refrigeration (N= 7, Figure 4). However, the meat treated with vehicle also presented a beneficial effect against the presence of TBARS.

The undesirable discoloration of meat during storage is largely due to myoglobin oxidation and MetMb formation (Mtibaa *et al.*, 2019). Moreover, the percentage of MetMb is

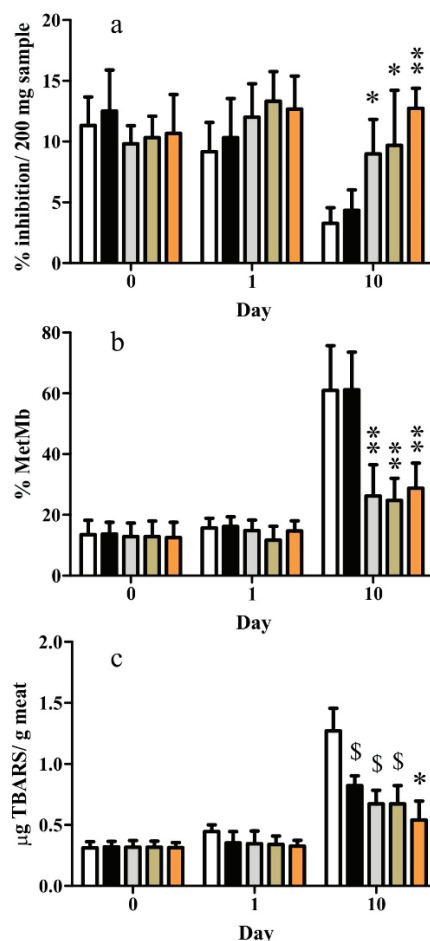


Figure 4. Antioxidant capacity (a), metmyoglobin (MetMb) content (b), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (c), found in samples obtained from the non-added meat (white bar) or added with the vehicle (black bar), butylated hydroxytoluene (gray bar), quercetin (brown bar), or the combination selected (orange bar). [§]P value of < 0.001 versus C. *P value of < 0.001 versus C and < 0.05 versus V. **P value of < 0.001 versus C and V.

Figura 4. Capacidad antioxidante (a), contenido de metamioglobina (MetMb) (b) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (c) encontrados en las muestras obtenidas de la carne no adicionada (barra blanca) o adicionada con el vehículo (barra negra), hidroxitolueno butilado (barra gris), quercetina (barra café) o combinación seleccionada (barra anaranjada). [§]Valor de P de < 0.001 versus C. *Valor de P de < 0.001 versus C y < 0.05 versus V. **Valor de P de < 0.001 versus C y V.

a significant variable given that consumers reject meat products with levels higher than 40 % (Mtibaa *et al.*, 2019). The 1:5 BQ combination produced a level of < 40 % MetMb in the ground beef patties, as did the BHT or quercetin treatments after ten days of storage (Figure 4b). As quercetin and BHT are free radical scavengers, they directly inhibited protein oxidation due to their antioxidant properties (Mtibaa *et al.*, 2019). Previous studies have shown that BHT or quercetin maintain lower percentages of MetMb in beef than those observed in non-supplemented meat for up to ten or nine days of refrigeration, respectively. However, the effect of the quercetin was reversed after the ninth day of storage (Bekhit *et al.*, 2003; Mtibaa *et al.*, 2019), due to the method used to add quercetin to the meat, thus influencing the performance of this antioxidant (Bekhit *et al.*, 2003; Bekhit *et al.*, 2004).

Hydrogen atom transfer and single electron transfer reactions, which are the most important pathways via which an antioxidant can scavenge free radicals, are solvent and pH dependent, and in this case, our solvent for quercetin was different to the study of Borgohain *et al.* (2015). The foregoing study prepared quercetin in deionized water with an adjusted pH of 6.8, adding it at a ratio of 111.1 mL/kg of meat (Bekhit *et al.*, 2003), while the present study prepared quercetin in food grade EVO, adding it at a ratio of 20 mL/kg meat. Thus, the food grade EVO was an appropriate medium for the antioxidant function of quercetin, and its use as a solvent was to obtain a homogeneous suspension of quercetin, as it is insoluble and precipitates rapidly in water at the concentration and volume used in the present study.

Because of the radical scavenger effects of the compounds tested, the meat antioxidant capacity presented by the 1:5 BQ combination was superior to that found in the non-supplemented meat, where this variable closely resembled the capacity produced by each compound when administered independently at high concentrations (Figure 4a). Moreover, the presence of BHT, quercetin or combination avoided the deterioration of the antioxidant ability in beef patties through time ($P > 0.05$ for B, Q and BQ groups on day 0, 1 and 10). A previous study found that BHT administered at 100 mg/kg did not produce a high antioxidant capacity in the ground meat, compared to that observed in the non-supplemented meat, after seven days of storage at 4 °C (Cantú-Valdéz *et al.*, 2020). However, said study added BHT in a dry form to the meat. As explained above, for the quercetin treated samples, the EVO (solvent) was also an appropriate medium for the performance of the BHT antioxidant activity (Borgohain *et al.*, 2015). We were unable to find, in the literature, a report of an evaluation of the antioxidant capacity of ground meat or patties supplemented with quercetin. Our data shows an increase in the capacity of the meat to resist oxidative processes by the BQ mixture, a finding confirmed by our protein oxidation evaluation (MetMb content).

The TBARS results obtained supports the protection provided to ground beef patties by the 1:5 BQ combination against lipid oxidation (Figure 4c). TBARS levels increase during storage, since they are reactive aldehydes produced

by lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids in meat (Mtibaa *et al.*, 2019). The vehicle used in the present study, EVO, played a role in the reduction of TBARS levels in the B, Q, and BQ samples (Figure 4c), which may be due to the EVO antioxidant properties (Borges *et al.*, 2019), although the meat antioxidant capacity induced via EVO was not found to be significant (Figure 4a). Nevertheless, the antioxidant synergism of the mixture tested (BQ group) produced a greater reduction of TBARS than that observed for the vehicle (Figure 4c). Prior data shows that the addition of BHT reduces or does not affect TBARS content in meat stored at 4 °C for seven-eight days (Gallego *et al.*, 2015; Mtibaa *et al.*, 2019). Also, quercetin was not observed to significantly modify TBARS levels in meat over nine days of storage at 2 °C (Bekhit *et al.*, 2003), findings similar to those observed for the non-supplemented meats.

Limitation of the study

Despite in the present study we evaluated important meat quality parameters for beef patties, including key predictors for the acceptability of a meat product by consumers, such as the redness and MetMb levels (Gallego *et al.*, 2015; Mtibaa *et al.*, 2019), it is clear that further studies are necessary to increase the actual evidence, such as sensory evaluations. Nevertheless, the present study is the beginning for the use of synergistic combinations of antioxidants to preserve meat products.

CONCLUSIONS

For the first time, our study shows that the use of a 1:5 BQ combination (5.2 mg/kg of BHT plus 26.0 mg/kg of quercetin) was an effective, simple, and available method for the preservation of beef patties. Since this strategy produced a synergistic antioxidant interaction between BHT and quercetin, it in turn improved color, levels of protein and lipid oxidation, and antioxidant capacity of the beef patties. These beneficial changes were possible to achieve with a simple combination of these preservatives that are available in the actual market and consequently, the individual use of high concentrations of BHT and quercetin by the meat industry can be substitute for their synergistic combination.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank to Othir G. Galicia-Cruz for their technical assistance. This study was financially supported by the economical stimuli to researchers acquired from the Sistema Nacional de Investigadores (SNI) - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

Alonso-Castro, A.J., Rangel-Velázquez, J.E., Isiordia-Espinoza, M.A., Villanueva-Solís, L.E., Aragon-Martinez, O.H. y Zapata-

- Morales, J.R. 2017. Synergism between naproxen and rutin in a mouse model of visceral pain. *Drug Development Research*. 78: 184-188. <https://doi.org/10.1002/ddr.21391>
- Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-Ernst, K.I. y Lampen, A. 2018. Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Molecular Nutrition & Food Research*. 62. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700447>
- Bekhit, A.E.D., Geesink, G.H., Ilian, M.A., Morton, J.D. y Bickerstaffe, R. 2003. The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chemistry*. 81: 175-187. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00410-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00410-7)
- Bekhit, A.E.D., Geesink, G.H., Ilian, M.A., Morton, J.D., Sedcole, J.R. y Bickerstaffe, R. 2004. Pro-oxidant activities of carnosine, rutin and quercetin in a beef model system and their effects on the metmyoglobin-reducing activity. *European Food Research and Technology*. 218: 507-514. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0904-7>
- Borges, T.H., Serna, A., López, L.C., Lara, L., Nieto, R. y Seiquer, I. 2019. Composition and antioxidant properties of spanish extra virgin olive oil regarding cultivar, harvest year and crop stage. *Antioxidants (Basel)*. 8: 217. <https://doi.org/10.3390/antiox8070217>
- Borghain, R., Guha, A.K., Pratihari, S. y Handique, J.G. 2015. Antioxidant activity of some phenolic aldehydes and their diimine derivatives: A DFT study. *Computational and Theoretical Chemistry*. 1060: 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2015.02.014>
- Cantú-Valdéz, J.A., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Martínez, C.A., Sinagawa-García, S.R., Quintero-Ramos, A., Hume, M.E., Herrera-Balandrano, D.D. y Méndez-Zamora, G. 2020. Mexican oregano essential oils as alternatives to butylated hydroxytoluene to improve the shelf life of ground beef. *Food Science & Nutrition*. 8: 4555-4564. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1767>
- Checkmahomed, L., Padey, B., Pizzorno, A., Terrier, O., Rosa-Calatrava, M., Abed, Y., Baz, M. y Boivin, G. 2020. In vitro combinations of baloxavir acid and other inhibitors against seasonal influenza A viruses. *Viruses*. 12: 1139. <https://doi.org/10.3390/v12101139>
- Chou, T.C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Research*. 70: 440-446. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
- Chou, T.C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*. 58: 621-681. DOI: 10.1124/pr.58.3.10
- Chou, T.C. y Martin, N. 2005. CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. *ComboSyn*. Paramus, NJ.
- Eymard, S., Carcouët, E., Rochet, M.J., Dumay, J., Chopin, C. y Genot, C. 2005. Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 1750-1756. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2145>
- Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L. y Zhang, G. 2021. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*. 171, 108829. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>
- Gallego, M.G., Gordon, M.H., Segovia, F.J. y Almajano, M.P. 2015. Caesalpinia decapetala extracts as inhibitors of lipid oxidation in beef patties. *Molecules*. 20: 13913-13926. <https://doi.org/10.3390/molecules200813913>
- Gonzalez-Rivera, M.L., Martinez-Morales, F., Alonso-Castro, A.J., López-Rodríguez, J.F., Aranda Romo, S., Zapata-Morales, J.R. y Aragon-Martinez, O.H. 2019. Matrix effect evaluation and validation of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation scavenging assay, as well as its application using a tejate, an ancient beverage in Mexico. *Chemical Papers*. 73: 2767-2781. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00829-3>
- International Conference on Harmonization. 2005. International conference on harmonization of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva, Switzerland.
- Kapetanakou, A.E., Pateraki, G.L. y Skandamis, P.N. 2020. Developing a commercial antimicrobial active packaging system of ground beef based on "tsipouro" alcoholic distillate. *Foods*. 9: 1171. <https://doi.org/10.3390/foods9091171>
- Kim, S.J., Min, S.C., Shin, H.J., Lee, Y.J., Cho, A.R., Kim, S.Y. y Han, J. 2013. Evaluation of the antioxidant activities and nutritional properties of ten edible plant extracts and their application to fresh ground beef. *Meat Science*. 93: 715-722. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.029>
- Liu, R. y Mabury, S.A. 2020. Synthetic phenolic antioxidants: a review of environmental occurrence, fate, human exposure, and toxicity. *Environmental Science & Technology*. 54: 11706-11719. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05077>
- Martinez-Morales, F., Alonso-Castro, A.J., Zapata-Morales, J.R., Carranza-Álvarez, C. y Aragon-Martinez, O.H. 2020. Use of standardized units for a correct interpretation of IC50 values obtained from the inhibition of the DPPH radical by natural antioxidants. *Chemical Papers*. 74: 3325-3334. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01161-x>
- Mtibaa, A.C., Smaoui, S., Ben Hlima, H., Sellem, I., Ennouri, K. y Mellouli, L. 2019. Enterocin BacFL31 from a safety Enterococcus faecium FL31: natural preservative agent used alone and in combination with aqueous peel onion (*Allium cepa*) extract in ground beef meat storage. *BioMed Research International*. 2019: 4094890. <https://doi.org/10.1155/2019/4094890>
- Electronic Code of Federal Regulations. Title 21, Chapter I, Subchapter B, Part 182, Subpart D, Sec. 182.3173. Butylated hydroxytoluene. [Consultado 12 Mayo 2021] 2021. Disponible en: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=a271652c302a4d8fb472e9e03ab4c34f&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#_top.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDKD). 2012. Quercetin. En: *LiverTox: Clinical and research information on drug-induced liver injury* [Internet]. NIDDKD (ed.), updated 28 Mar 2020, Bethesda, MD. [Consultado 12 Mayo 2021] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556474/>.
- Querfelli, M., Villasante, J., Ben Kaâb, L.B. y Almajano, M. 2019. Effect of neem (*Azadirachta indica* L.) on lipid oxidation in raw chilled beef patties. *Antioxidants (Basel)*. 8: 305. <https://doi.org/10.3390/antiox8080305>
- Popovic-Milenkovic, M.T., Tomovic, M.T., Brankovic, S.R., Ljujic, B.T. y Jankovic, S.M. 2014. Antioxidant and anxiolytic

- activities of *Crataegus nigra* Wald. et Kit. berries. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 71: 279-85.
- Ravindranath, R., Periasamy, A.P., Roy, P., Chen, Y.W. y Chang, H.T. 2018. Smart app-based on-field colorimetric quantification of mercury via analyte-induced enhancement of the photocatalytic activity of TiO₂-Au nanospheres. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410: 4555-4564. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1114-7>
- Sebaugh, J.L. 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*. 10: 128-134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>
- Singh, D.P., Verma, S. y Prabha, R. 2018. Investigations on antioxidant potential of phenolic acids and flavonoids: the common phytochemical ingredients in plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*. 6: 1000219. DOI: 10.4172/2329-9029.1000219
- Tallarida, R.J. 2002. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*. 98: 163-168. DOI: 10.1016/s0304-3959(02)00041-6
- US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research y Center for Veterinary Medicine. 2018. Bioanalytical method validation: guidance for industry. Maryland, United States of America. [Consultado 12 Mayo 2021] Disponible en: <https://www.fda.gov/media/70858/download>.
- US Food and Drug Administration (FDA). 2019. Food additive status list. [Consultado 12 Mayo 2021] Disponible en: www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list#ftnB.
- Wang, W. y Kannan, K. 2019. Quantitative identification of and exposure to synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene, in urine. *Environment International*. 128: 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.028>
- Weinroth, M.D., Britton, B.C., McCullough, K.R., Martin, J.N., Geornaras, I., Knight, R., Belk, K.E. y Metcalf, J.L. 2019. Ground beef microbiome changes with antimicrobial decontamination interventions and product storage. *PLoS One*. 14: e0217947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217947>
- Zahid, M.A., Seo, J.K., Parvin, R., Ko, J. y Yang, H.S. 2019. Comparison of butylated hydroxytoluene, ascorbic acid, and clove extract as antioxidants in fresh beef patties at refrigerated storage. *Food Science of Animal Resources*. 39: 768-779. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e67>
- Zapata-Morales, J.R., Alonso-Castro, A.J., Muñoz-Martínez, G.S., Martínez-Rodríguez, M.M., Nambo-Arcos, M.E., Brennan-Bourdon, L.M., Aragón-Martínez, O.H. y Martínez-Morales, J.F. 2021. In vitro and in vivo synergistic interactions between the flavonoid rutin with paracetamol and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Archives of Medical Research*. S0188-4409(21)00078-3. <https://doi.org/10.1016/j.arcm.2021.03.007>

Prevalencia y relación de mastitis con niveles séricos de vitaminas E y A y estatus microbiológico en vacas criollas doble propósito, en época de verano

Prevalence of mastitis and its relation with vitamins E and A serum levels and microbiological status in dual purpose creole cows, in summer season

Araceli Pinelli-Saavedra^{1*}, Rosalva Perez-Morales¹, Humberto González-Ríos¹, Alejandra Amavizca-Nazar²

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, 83304, Hermosillo, Sonora, México.

² Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería. Carretera Hermosillo-Bahía de Kino, km 21, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de mastitis subclínica en ganado de doble propósito en pastoreo a través de microbiología en leche y su asociación con niveles séricos de las vitaminas E y A en un ejido de la región central del estado de Sonora, México, en verano donde las temperaturas rebasan los 40°C. Se analizaron 504 muestras de leche correspondientes a los cuatro cuartos de 126 vacas para cultivo microbiológico: pruebas de catalasa, coagulasa y oxidasa. La sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos fue por el método de Kirby-Bauer. Las vitaminas A y E fueron analizadas por HPLC. El índice de temperatura y humedad relativa se midió relacionando temperatura ambiente y humedad relativa. Se encontró una prevalencia del 65.80% y especies Gram positivos en racimos, coagulasa y catalasa positiva; oxidasa negativa que suponen del género *Staphylococcus sp.* La ceftriaxona fue el antibiótico al que mostraron resistencia. Los valores séricos de vitamina A (0.59 μmol/L) y E (5.58 μmol/L) fueron menores a los normales y no correlacionados ($P > 0.05$) con mastitis. Los animales mostraron estrés calórico moderado (THI ≥ 80). Se encontró una alta prevalencia de mastitis subclínica no asociada a las vitaminas y deficiencias de las vitaminas E y A

Palabras clave: Mastitis, Vitamina A, Vitamina E, Microbiología de la leche, Verano.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the prevalence of subclinical mastitis in dual-purpose cattle under grazing conditions through milk microbiology, and its association with serum levels of vitamins E and A in ranches located in the central region of Sonora México, during the summer where temperatures exceed 40 °C. Milk samples were collected from the four quarters of 126 cows, for microbiological culture, including evaluation of catalase, coagulase, and oxidase activity. The isolates were tested for antimicrobial sensitivity by the Kirby-Bauer method (disk-diffusion on agar). Vitamin A and E were analyzed by HPLC. Temperature and relative humidity index (THI) were measured by relating ambient temperature and relative humidity. Mastitis

prevalence was 65.80%, and the presence of Gram-positive species in clusters, coagulase and catalase-positive and oxidase negative, suggests the presence of *Staphylococcus sp.* Furthermore, the highest resistance found was against the ceftriaxone antibiotic. Serum values of vitamin A and E, 0.59 and 5.58 μmol/L respectively, were lower than normal values, and did not correlate with mastitis. The animals were under moderate heat stress (THI ≥ 80). We conclude a high prevalence of subclinical mastitis not associated with vitamins and deficiencies of vitamins E and A in summer.

Keywords: Mastitis, Vitamin A, Vitamin E, Milk Microbiology, Summer.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una enfermedad que afecta la salud de las vacas, como consecuencia la producción y calidad de leche se ven gravemente disminuidas (Srednik *et al.*, 2015). Esta patología genera grandes pérdidas económicas para los productores de leche, debido a que aumentan los costos de tratamiento, llegando en ocasiones al sacrificio prematuro del ganado infectado (Duarte *et al.*, 2015). La mastitis clínica se caracteriza por presentar cambios exteriores como inflamación de la ubre aspecto y consistencia de la leche producida, de ahí que la mayoría de los productores se centren en ésta. Sin embargo, también puede ocurrir sin cambios exteriores en la ubre que indiquen alguna anomalía y a esto se le conoce como mastitis subclínica (Blowey y Edmondson, 2010). La presencia de mastitis puede deberse a diversos factores que van desde la zona geográfica, el clima, periodos de sequía, fuga de leche, nutrición, higiene, entre otros (Olivares-Perez *et al.*, 2015).

Dentro de los factores antes mencionados, la nutrición puede influir en la resistencia de la vaca a la mastitis. Las vacas con balance energético negativo tienen un mayor riesgo de desarrollar cetosis, y este trastorno metabólico favorece hasta dos veces en el riesgo de presentar mastitis clínica (Noro y Barboza, 2012). Además, las deficiencias de ciertos micro minerales y de las vitaminas E y A pueden aumentar el riesgo de padecer esta enfermedad, ya que estas biomoléculas están relacionadas con mastitis. Las vitaminas

*Autor para correspondencia: Araceli Pinelli Saavedra
 Correo electrónico: pinelli@ciad.mx

Recibido: 16 de agosto de 2021

Aceptado: 24 de noviembre de 2021

A y E son conocidas por su función como antioxidante y en el sistema inmune (Sordillo, 2016). Estudios indican el papel antioxidante de estas vitaminas durante la mastitis además que mejoran la capacidad bactericida de los neutrófilos polimorfonucleares, que son la primera línea de defensa frente a los patógenos que producen la mastitis (Dey *et al.*, 2019; Damarany, 2021). Reportes han mencionado que la prevalencia de la mastitis está relacionada con el estado nutricional de la vitamina E y selenio en el ganado lechero, ya sea por deficiencia de estos micronutrientes en los pastos donde es criado el ganado lechero o porque el alimento no cubre los requerimientos (Smith *et al.*, 1997; O'Rourke, 2009; Damarany, 2021). De ahí que, uno de los puntos para mantener un estado saludable en el ganado lechero es tener un programa nutricional balanceado.

Por otro lado, en el ejido donde se realizó este estudio mantiene a sus animales bajo el sistema productivo extensivo, por lo que la disponibilidad de pasto y la calidad de éste depende de las condiciones de temperatura, lluvias y suelo en la cual se encuentren (Lauridsen y Jensen, 2005). Lo anterior, puede contribuir a que ocurra una deficiencia de las vitaminas E y A, y que se relacionan con la mastitis. Así mismo, en esta región se registran temperaturas máximas de hasta 45°C durante la época de verano, periodos en los cuales el alimento principal del ganado es la pastura y pierde sus nutrientes esenciales como los β -carotenos y tocoferoles. Aunado a ello, el ganado puede estar sometido a estrés por calor en esta época, lo que provoca que el consumo de alimento disminuya, esto ocasiona que la vaca entre en balance energético negativo y su estatus oxidativo sea afectado, siendo éste un factor relacionado con la prevalencia de mastitis (Thompson y Dahl, 2012; Hammami *et al.*, 2013; Vitali *et al.*, 2016; Gernand *et al.*, 2019). Jingar *et al.* (2014) reportaron un aumento de las incidencias mastitis en relación con el aumento del índice de temperatura y humedad relativa (THI por sus siglas en inglés) para vacas lecheras en climas cálidos en la India. Un estudio más reciente, reportó que valores THI ≥ 79 fueron asociados con alta incidencia de mastitis clínica en vacas primíparas y que el mes de Julio fue el que mostró el mayor efecto en la incidencia de mastitis (Vitali *et al.*, 2016).

Adicionalmente, la presencia de agentes microbiológicos de origen bacteriano, asociados a la mastitis están asociados a *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN), desarrollando la infección intramamaria y la condición subclínica los días posteriores al parto. Así mismo, *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) y otros patógenos, también pueden ocasionar mastitis, pero en menor número de casos reportados (De Vliegher *et al.*, 2012). Otro grupo de bacterias, comúnmente aislados en casos de mastitis, son los denominados Coliformes como: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, entre otros (Oliver *et al.*, 2011). *Escherichia coli* es un microorganismo oportunista ambiental que, en la mayoría de los casos, suele causar infecciones intramamarias transitorias en las vacas, así como infecciones intramamarias persistentes (Fairbrother *et al.*, 2015). Los agentes microbiológicos también pueden ser afectados por las temperaturas ambientales

como las descritas anteriormente que se presentan en la región donde se realizó el estudio de diagnóstico. De ahí que el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de mastitis subclínica en ganado de doble propósito en pastoreo a través de microbiología en leche y su asociación con niveles séricos de las vitaminas E y A en un ejido localizado en la región central estado de Sonora, México durante el verano donde las temperaturas rebasan los 40°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en un ejido de la región central del estado de Sonora, México, localizado a una longitud de 28° 53' 44" y latitud de -110° 14' 53". Esta comunidad, está compuesta por pequeños productores, donde el sistema de alimentación se basa en el pastoreo extensivo.

El ejido cuenta con 13 pequeños productores de ganado bovino de doble propósito con un total 356 vacas de ordeña. Se realizó la estimación de la media poblacional con un muestreo aleatorio simple de 5 ranchos con una n=126 vacas que se encontraban en ordeña durante el verano. A las 126 vacas se les realizaron la prueba de campo California y análisis microbiológicos en la leche para detectar la mastitis subclínica y la prueba sensibilidad a antibióticos. La prevalencia de mastitis se calculó mediante el porcentaje de vacas infectadas, dividido entre el número total de vacas analizadas por 100.

Para el análisis serológico de vitaminas E y A, se muestrearon 25 vacas sanas y 35 con mastitis subclínica.

La recolección de las muestras de leche y sangre se realizaron dentro de las directrices oficiales mexicanas de la Norma oficial Mexicana NOM-EM-051-ZOO-1995 que involucran el manejo de animales y el cuidado de éstos.

Detección de mastitis

La colecta de muestra de leche se tomó descartando los primeros mililitros de leche (despunte) para minimizar la contaminación y eliminar la microbiota que normalmente se encuentra en cisterna y orificio del pezón. La ubre y el pezón se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.1% y se secaron cada cuarto con una toalla de papel individual. La limpieza y el muestreo de los pezones se realizaron en el sitio de ordeña para la prueba de campo California y para análisis microbiológico.

Prueba de California. La prueba de California consistió en agregar aproximadamente 4-5 mL de leche aproximadamente de cada pezón, a cada uno de los cuatro depósitos de la paleta, cuidando la ubicación de cada depósito respecto a la posición de cada pezón. Posteriormente se agregó el reactivo de California (arilalquilsulfonato de sodio Diagmastin de Sanfer®) en la misma proporción que la leche (4-5 mL aproximadamente) y se movió la paleta en forma de círculos para mezclar ambos componentes. La prueba positiva se da por la formación de un conglomerado gelatinoso visible a simple vista (Bedolla *et al.*, 2007; Zuluaga *et al.*, 2010).

Análisis Microbiológico. Una vez desinfectados los pezones la muestra se obtuvo directamente de la ubre de los animales. Se ordeñaron aproximadamente 100 mL de leche y se empaquetaron en bolsas estériles whirlpak (NASCO, Fort Atkinson, WI USA). Las muestras se transportaron en hielo a 4-10 °C a las instalaciones de CIAD, A.C en Hermosillo, Sonora, México, en aproximadamente 1 h 30 minutos.

Una vez en el laboratorio, de cada muestra se tomaron 10 µL de leche, para inocular placas de agar sangre Difco® al 5% y placas de agar Baird-Parker Difco®. Las placas inoculadas se incubaron (37 °C por 24-48 h) en aerobiosis en una estufa de cultivo Mod E Riossa. Las colonias que se desarrollaron en los medios de cultivo, producto del crecimiento bacteriano, fueron sembradas en agar nutritivo Difco® para su aislamiento y obtención de cultivo puro, a las condiciones anteriormente descritas. A cada colonia obtenida se le realizó las pruebas de oxidasa, coagulasa, catalasa y tinción Gram para la clasificación de género (Forbes, 2009).

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Para establecer el antibiótico más adecuado se realizaron pruebas de sensibilidad antimicrobiana que a continuación se describen.

Técnica de disco-difusión en agar. Se realizó un antibiograma a cada una de las cepas aisladas de las muestras de leche, utilizando como cepa control *E. coli* ATCC 25922, teniendo como resultado los patrones de resistencia a antimicrobianos, mediante la Técnica de Kirby-Bauer (Ituarte-Robles y Bracamonte-Mendoza, 2015). Los antibióticos utilizados se muestran en la Tabla 1.

Preparación del inóculo. Para la preparación del inóculo bacteriano, las colonias seleccionadas fueron transferidas al agar nutritivo (Difco®) se incubaron a 37°C 24-48 h. Se estandarizó el inóculo bacteriano utilizando las colonias completamente aisladas del cultivo previo en agar nutritivo. La preparación del inóculo se hizo en 5 mL de solución salina al 0.85 %, y se igualó a la turbidez del estándar Núm. 0.5 del nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 cel/mL) (Ituarte-Robles y Bracamonte-Mendoza, 2015). Esta técnica se realizó

usando agar Mueller Hinton Difco®. El inóculo estandarizado se sembró masivamente por toda la placa con la ayuda de un hisopo estéril. Se colocaron los discos de antibióticos, máximo 4 discos por cada placa. Se incubó a 37 °C de 18 a 20 h en aerobiosis. Posterior a la incubación se procedió a medir (mm) los halos (diámetro) de inhibición, con el fin de obtener la relación de sensibilidad antibacteriana para cada antibiótico. Las lecturas se compararon con las tablas con los rangos de las tablas establecidas de la casa comercial del antibiótico marca BD BBL.

Determinación sérica de vitamina E y A

La extracción de vitamina E y A en suero de la sangre extraída de la vena yugular de los animales, se hizo siguiendo el método reportado por Hess *et al.* (1991). Brevemente, a 400 µL de suero se le adicionaron 400 µL de etanol y se agitaron usando un vortex por 10 segundos posteriormente se adicionaron 700 µL de hexano (con 0.025% de BHT) y agitaron por 10 min, y se centrifugaron por 5 min a 14000 rpm, la capa de hexano se removió y se dejó evaporar. Posteriormente, se reconstituyeron adicionando 400 µL de la fase móvil metanol-agua 90:1 y se agitaron por 5 min antes de inyectarse la muestra en HPLC. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Los sobrenadantes obtenidos en las extracciones, se filtraron (filtro 0.2 µmol) e inyectaron a un equipo HPLC (Thermo Scientific Accela 100114), con un detector UV-Visible, columna C-18 10 cm x 4.6 mm DI, 3µmol, loop 10 µL y $\lambda=290$ nm, con una fase móvil 98%; 2% (metanol-agua). El cálculo de la concentración se realizó de acuerdo con el estándar el área bajo la curva (Hess *et al.*, 1991). Los valores de vitaminas fueron reportados como µmol/L. Para vitamina E, se consideraron valores deficientes aquellos <6.96 µmol/L y normales valores entre 6.96 a 20.94 µmol/L. Para la vitamina A, se consideraron valores deficientes aquellos valores <0.872 µmol/L y normales valores entre 0.872 a 2.795 µmol/L (NRC, 2001).

Índice de temperatura y humedad (THI)

El THI es una medida indirecta para evaluar el estrés calórico de los animales. El THI se determinó, con la ecuación descrita por Collier *et al.* (2012), en la cual T es la temperatura (°C) y HR es humedad relativa (%):

$$THI = (T - (0.55 - (0.55 * HR / 100)) * (T - 58))$$

La temperatura ambiental y humedad relativa fueron obtenidas de los registros de la Estación Meteorológica EMA-26021-01 localizada a una latitud 28.8237, longitud -110.64286. Se estimó la relación del THI con el efecto del estrés por calor; si el resultado derivado de la ecuación fue menor o igual a 67 se consideró normal (no hay estrés por calor), si resultó entre 68 a 71 había un umbral de estrés, de 72 a 79 era un estrés por calor de leve, de 80 a 89 se considera como estrés moderado y mayor o igual a 90 como estrés severo por calor extremo (Collier *et al.*, 2012).

Tabla 1. Antibióticos comerciales BD® utilizados.

Table 1. Commercial BD® antibiotics used.

| Antibiótico | Cantidad/disco (µg) |
|-----------------------------------|---------------------|
| Fosfomicina (BD) | 50 |
| Cefalotina (BD) | 30 |
| Penicilina (BD) | 10 U |
| Amoxicilina / A. Clavulánico (BD) | 20/10 |
| Ampicilina (BD) | 10 |
| Cefazolina (BD) | 30 |
| Ceftriaxona (BD) | 30 |
| Sulfametoxazol/trimetoprim (BD) | 23.75/1.25 |
| Tetraciclina (BD) | 30 |
| Eritromicina (BD) | 15 |
| Gentamicina (BD) | 10 |

Diseño experimental y análisis estadístico

La prevalencia subclínica de mastitis fue reportada como el porcentaje de vacas positivas del total del hato muestreado, entendiéndose por vaca positiva aquellas que presentaron al menos una glándula positiva en la prueba de California y/o análisis microbiológico. Para estimar la proporción de animales con niveles séricos normales y deficientes de las vitaminas E y A y su relación con el número de animales sanos o con mastitis, se realizó la prueba de dependencia Ji-cuadrado. Así mismo, se compararon los valores medios de las vitaminas E y A entre vacas sanas y con mastitis, mediante la prueba de T para dos muestras independientes. Las mediciones de los halos de inhibición (mm) de los antibióticos fueron analizados mediante una ANOVA de una vía, y las medias fueron comparadas con la prueba Tukey-Kramer. Las significancias fueron consideradas a una probabilidad en el error de 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el paquete estadístico NCSS versión 2007 (Hintze, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de las 126 vacas estudiadas, se encontró que 64 vacas presentaron mastitis subclínica detectada mediante la prueba californiana y 83 vacas por el análisis microbiológico, lo que representa una prevalencia del 50.70% y 65.80% respectivamente. Estos porcentajes tan altos reflejan la necesidad de implementar métodos diagnósticos, así como un monitoreo constante de esta enfermedad, ya que comúnmente en esta zona ganadera no se realizan.

En estudio realizado en Pernambuco, Brasil, se emplearon tres métodos de detección para mastitis subclínica: conteo de células somáticas, Prueba de California y análisis microbiológico, encontrando una prevalencia de mastitis bovina del 63.3%. Además, en el mismo estudio, se estimó los porcentajes de mastitis de acuerdo con el tipo de ordeña (mecánica o manual), observándose una prevalencia 63.3% y 57.2% respectivamente, encontrando que en la ordeña mecánica hubo una mayor propagación de la enfermedad y esto podría deberse a que no hubo una limpieza correcta de la máquina de ordeña (Ruiz *et al.*, 2011). A diferencia con nuestro estudio en donde la ordeña fue manual.

Otros estudios que reportan prevalencias de mastitis en México, por ejemplo, en Tarímbaro, Michoacán, reportó un 43.14% de prevalencia de mastitis (Figueroa y Cedeño, 2008). Otro estudio realizado en Santa Ana, Sonora, reportó una prevalencia del 18.30% para mastitis subclínica y 5.35% para mastitis clínica, un porcentaje menor que el encontrado en el presente estudio. La marcada diferencia entre la prevalencia del presente estudio y la encontrada en investigación previa en otra región de Sonora, se debe a que el estudio en Santa Ana, Sonora, solo se utilizó la prueba de California, que es una prueba de campo confiable pero cuando la enfermedad está en etapas tempranas aún no hay suficientes células somáticas y por lo tanto, arroja un resultado negativo (Gerlach *et al.*, 2009). En cambio, el análisis microbiológico es más específico y sensible desde etapas tempranas de la enfermedad, como se vio reflejado en estos resultados.

Análisis microbiológico

En estudios realizados en Latinoamérica reportan que el género *Corynebacterium sp.*, bacilo Gram positivo, es el de mayor prevalencia, seguido por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sp.*, también con porcentaje considerable *E. coli* (Ruiz *et al.*, 2011). En nuestro estudio se aprecia que el 92.5% de los aislamientos fueron cocos Gram positivos en racimos, catalasa positiva, oxidasa negativa, y coagulasa positiva, lo que hace suponer que pertenecen al género *Staphylococcus sp.*, siendo muy pocos los cocos Gram positivos en cadena con un 4.5% y un 3% de bacilos Gram positivos. No se cultivaron bacilos Gram negativo confirmando así, que la mastitis bovina en las vacas analizadas no es por la contaminación de heces en el establo ni por la manipulación de muestras, y sólo por agentes causales de la mastitis bovina en sí. Resultados similares fueron reportados en el cual identificaron *S. aureus* en mastitis clínica bovina y observaron que en las muestras de leche de mastitis clínica contagiosa los microorganismos aislados coagulasa positivos (CP) 85.2 % fueron mayor respecto a coagulasa negativo (CN) 14.8% (Omara, 2017).

Sensibilidad antimicrobiana

En la tabla 2, se muestran los resultados de la sensibilidad antimicrobiana que se realizó a las cepas aisladas de las muestras de leche de vacas mastíticas, como se observa a excepción de la ceftriaxona, todos los demás antibióticos muestran ser efectivos ante las cepas probadas en este trabajo.

Estos resultados muestran que los antibióticos fosfomicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina, cefazolina muestran una mejor acción contra los microorganismos causales de la mastitis bovina en los hatos estudiados, seguidos por tetraciclina, eritromicina, gentamicina y sulfametoxazol/trimetoprim. Como anteriormente fue mencionado, el de menor eficiencia es la ceftriaxona al que

Tabla 2. Media de halos de inhibición para cada uno de los antibióticos analizados.

Table 2. Mean of inhibition halos for each antibiotic analyzed.

| Antibiótico | Media de Halo de Inhibición (mm) | Error estándar | Sensibilidad/ Resistencia |
|------------------------------|----------------------------------|----------------|---------------------------|
| Fosfomicina | 40 ^a | 0.57 | S |
| Penicilina | 39 ^a | 0.57 | S |
| Ampicilina | 38 ^a | 0.58 | S |
| Amoxicilina / A. clavulánico | 37 ^a | 0.57 | S |
| Cefalotina | 37 ^a | 0.57 | S |
| Cefazolina | 35 ^a | 0.58 | S |
| Tetraciclina | 28 ^b | 0.57 | S |
| Eritromicina | 28 ^b | 0.57 | S |
| Gentamicina | 27 ^b | 0.57 | S |
| Sulfametoxazol/trimetoprim | 26 ^b | 0.57 | S |
| Ceftriaxona | 21 ^c | 0.57 | R |

^{abc} Medias con diferente letra, indican diferencia (P<0.05).

se observó una mayor resistencia. El éxito de un tratamiento antibacteriano contra la mastitis bovina está determinado por una elección adecuada del antibiótico. Se recomiendan: β -lactámicos, aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos, tetraciclina, trimetropim-sulfonamidas combinadas, y fluoroquinolonas (McDougall *et al.*, 2014).

En este estudio se incluyeron la mayoría de las familias de los antibióticos para evaluar la sensibilidad con las cepas obtenidas. No se sabe con certeza el nombre de las cepas analizadas, pero como se explicó anteriormente la mayoría presentaron características del género *Staphylococcus sp.* Hay estudios en Latinoamérica que demuestran alta resistencia antimicrobiana de este género. En Brasil, se reportó que una resistencia de este género contra oxacilina que pertenece a los betalactámicos, así como la penicilina, amoxicilina, ampicilina que se analizaron en este trabajo; sin embargo, no se reflejó esa resistencia encontrada en otras regiones, esto puede deberse a que las cepas no presentaron multi-resistencia. Por otro lado, en ese estudio se observó que al utilizar otros antibióticos, por ejemplo, la asociación de Neomicina, Bacitracina y Tetraciclina, este género era inhibido por estos antibióticos, seguido por el Florfenicol (Brito *et al.*, 2001). En este trabajo se encontró una gran diversidad genética en las cepas aisladas y como consecuencia, la resistencia y susceptibilidad a los diferentes antibióticos.

Concentración sérica de vitamina E

La concentración sérica promedio de vitamina E durante el verano fue de 5.58 $\mu\text{mol/L}$. Este valor se considera como deficientes, ya que los valores normales séricos de vitamina E para vacas lecheras son de 6.96 a 20.94 $\mu\text{mol/L}$. De acuerdo con la clasificación de la NRC (2001). El 38% de las vacas estaban sanas pero deficientes de vitamina E; un 25.3% eran sanas con valores normales de vitamina E; el 19.3% presentaron mastitis y fueron deficientes de esta vitamina y el 17.3% presentaron la enfermedad y con valores normales. Al comparar estos porcentajes, no se encontró una asociación ($P>0.05$) entre el estado de salud de las vacas con respecto a la deficiencia o no de la vitamina E (Figura 1A).

Los niveles séricos de vitamina E entre vacas sanas y con mastitis fueron similares ($P>0.05$) Figura 1B.

En un reporte previo, en el que se suplementó vitamina E en tres niveles concentraciones a vacas lecheras con mastitis, se encontró que en el grupo con la dieta más alta en vitamina E los casos de mastitis disminuyeron y los animales mostraron niveles séricos mayores a 6.98 $\mu\text{mol/L}$ (Smith *et al.*, 1997). Por otro lado, en otro estudio no encontraron efecto significativo al suplementar 1,610 mg de acetato RRR- α -tocoferil en la dieta, ya que no se mejoró la salud de la glándula mamaria ni otras enfermedades relacionadas (Waller *et al.*, 2007). Por su parte, otro autor sugiere que vacas en periodo seco se le debe suplementar de 1000 a 3000 UI de vitamina E/día y a vacas lactando con 500 a 1000 UI de vitamina E/día; además que en establos con problemas de mastitis se debe suplementar hasta 3000 UI de vitamina E/día para alcanzar niveles en sangre mayores a 6.98 $\mu\text{mol/L}$

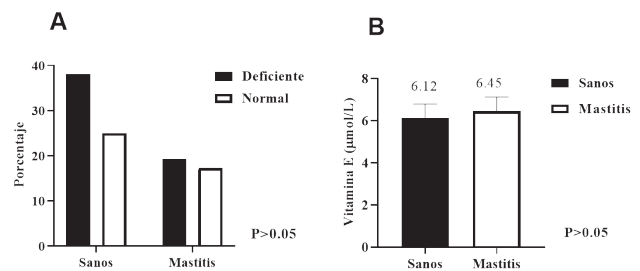


Figura 1. (A) Porcentajes de animales sanos y con mastitis que presentaron deficiencia o valores normales de vitamina E. (B) Valores medios de vitamina E en animales sanos y con mastitis durante el verano. N=60 (35 vacas con mastitis y 25 vacas sanas). Se consideran deficientes valores <6.96 $\mu\text{mol/L}$ y normales valores entre 6.96 a 20.94 $\mu\text{mol/L}$.

Figure 1. (A) Percentages of healthy animals and with mastitis, presenting vitamin E deficiency or normal values. (B) Mean values of vitamin E in healthy animals and with mastitis during the summer. N = 60 (35 cows with mastitis and 25 healthy cows). Deficient values <6.96 $\mu\text{mol/L}$ and normal values between 6.96 to 20.94 $\mu\text{mol/L}$ are considered.

(Politis *et al.*, 2012). Recientemente, un estudio comparó la suplementación de vitaminas de origen sintético el acetato de alfa tocoferil, y no se encontraron diferencias respecto al grupo testigo en cuanto a concentraciones >6.98 $\mu\text{mol/L}$ en sangre. Sin embargo, las no suplementadas con vitaminas sintéticas presentaron más casos de mastitis y conteo de células somáticas (Johansson *et al.*, 2014).

En otro estudio, se aplicó vía intramuscular una inyección de 3000 IU de acetato de RRR- α -tocoferil, y se observó que la concentración de vitamina E en suero fue 6.87 $\mu\text{mol/L}$, cercano a los valores normales (6.96-20.94 $\mu\text{mol/L}$). Sin embargo, no encontraron asociación con mastitis (LeBlanc *et al.*, 2004). Así mismo, cuando se aplicaron dos inyecciones de vitamina E en el período periparto (15 mL de acetato dl- α -tocoferil equivalente a 2100 mg en cada una de las inyecciones), no encontraron efecto significativo en cuanto a concentraciones en sangre, con valores por debajo de las normales y tampoco encontraron un efecto con respecto a la enfermedad de mastitis (Bourne *et al.*, 2008). Los resultados anteriores son similares a los observados en el presente estudio, sin asociación con la mastitis; sin embargo, los autores suplementaron la vitamina y en nuestro estudio no hubo suplementación.

Otros autores, dividieron en dos grupos de vacas Holstein de acuerdo con la infección mamaria durante el periodo periparto. Uno de ellos con infección mamaria y el otro sano; encontraron que vacas con mastitis presentaba valores más bajos de vitamina E en sangre respecto al grupo de vacas sanas (Rezamand *et al.*, 2007).

Como se puede observar, de acuerdo con reportes previos los requerimientos de vitamina E para ganado con mastitis y según la etapa fisiológica de la vaca no están bien establecidos tanto en la dieta como vía inyección intramuscular. Por lo que se requiere hacer más estudios al respecto.

Concentración sérica de vitamina A

Las concentraciones séricas para vitamina A durante la época de verano fue de $0.59 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$, mostrando

deficiencia ya que el rango considerado normal según la NRC (2001) para ganado lechero es de 0.872-2.792 $\mu\text{mol/L}$. Según la clasificación del estado de salud de vacas para las concentraciones séricas de vitamina A en sangre, se encontró que: el 54.7% de las vacas eran sanas, con deficiencias de vitamina A; el 8.7% eran vacas sanas con valores normales de vitamina A; el 29.3% tenían mastitis con deficiencia de vitamina A y el 7.3% presentaban mastitis y valores normales para esta vitamina. Tampoco se encontró asociación ($P>0.05$) entre la presencia de mastitis del ganado lechero y la concentración de vitamina A (Figura 2A).

Al comparar el grupo de vacas sanas contra las que tenían mastitis (Figura 2B), no se encontraron diferencias en los valores séricos de esta vitamina ($P>0.05$).

Respecto a los valores encontrados en nuestro estu-

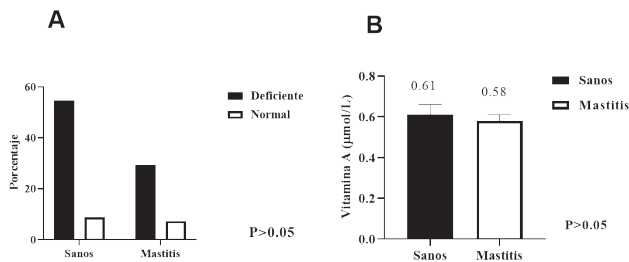


Figura 2. (A) Porcentajes de animales sanos y con mastitis que presentaron deficiencia o valores normales de vitamina A. (B) Valores medios de vitamina A en animales sanos y con mastitis durante el verano. N= 60 (35 vacas con mastitis y 25 vacas sanas). Son deficientes valores $<0.872 \mu\text{mol/L}$ y normales valores entre 0.872 a 2.795 $\mu\text{mol/L}$.

Figure 2. (A) Percentages of healthy animals and animals with mastitis, presenting vitamin A deficiency or normal values. (B) Mean values of vitamin A in healthy animals and with mastitis during the summer. N = 60 (35 cows with mastitis and 25 healthy cows). Deficient values $<0.872 \mu\text{mol/L}$ and normal values between 0.872 to 2.795 $\mu\text{mol/L}$ are considered.

dio a otros: LeBlanc *et al.* (2004) reportaron que valores de vitamina A previo y posterior al parto fueron de 149 ng/mL (0.52 $\mu\text{mol/L}$) y 191 ng/mL (0.66 $\mu\text{mol/L}$) respectivamente. Los autores mencionan que valores por arriba de los 100 ng/mL (0.34 $\mu\text{mol/L}$) se reducía la presencia de mastitis. Sin embargo si se consideran los rangos normales de vitamina A (0.87-2.79 $\mu\text{mol/L}$), reportados por la NRC 2001 estuvieron por debajo o fueron deficiente de esta vitamina. Este patrón de respuesta concuerda con lo que se encontró en nuestro estudio de 0.59 $\mu\text{mol/L}$. En una investigación realizada en Turquía evaluaron las concentraciones en sangre de vitamina A durante la gestación del ganado lechero y encontraron que al parto la concentraciones eran mas bajas respecto a los primeros meses de gestación, obtuvieron una valor de 1.39 $\mu\text{mol/L}$ que está dentro de los valores normales (0.877-2.792 $\mu\text{mol/L}$). Sugiriendo que se debe de suplementar durante este periodo con vitaminas agregadas a la dieta del ganado para así poder prevenir enfermedades tales como la mastitis entre otras (Yildiz *et al.*, 2005).

Por otro lado, una falta de asociación entre los valores séricos de las vitaminas E y A y mastitis también fue reportada en otro estudio en el cual estas vitaminas no fueron

significativamente asociadas a la mastitis. En cuanto a las deficiencias de las vitaminas encontradas en nuestro estudio pueden estar relacionadas al estrés por calor, que promueve un aumento producción de especies reactivas de oxígeno y estas vitaminas se requieren en mayor medida para neutralizar ese efecto (Abuelo y Hernández, 2019; Strickland *et al.*, 2021).

Índice de temperatura y humedad (THI)

La prevalencia alta encontrada en verano pudo ser debido a que lo animales estuvieron sujetos a estrés por calor, ocasionado por las altas temperaturas que se presentaron en esta región de estudio durante el verano (superiores a 42°C). Collier *et al.* (2012) reportaron que el estrés por calor se da cuando la temperatura ambiental y humedad relativa superan un THI (índice de temperatura humedad) ≥ 71 . Esto provoca que el ganado reduzca la ingesta de comida, la producción de leche, la inmunidad, la tasa de concepción y aumenta la mortalidad, la presencia de células somáticas en la leche y mastitis en el ganado lechero. Los valores de THI estimados para la época de verano se muestran en la Figura 1, y hacen constar que, durante la mayor parte del tiempo de muestreo durante el verano, los animales estuvieron expuestos a un estrés moderado THI ≥ 80 según los parámetros reportados por Collier *et al.* (2012).

En estudios previos monitorearon los valores de THI durante seis años, así como también los casos de mastitis, y encontraron que un THI por arriba de 80, aumentó el número de casos de mastitis clínica a un 6% (Morse *et al.*, 1987). Otro estudio realizado en Estados Unidos comparó los valores de THI durante verano e invierno contra la presencia de mastitis. Para invierno obtuvieron valores de THI de 53-57 y en verano valores de 75-76 considerado este rango como estrés ligero por calor y encontrándose que durante estos meses aumentó el número de casos de mastitis al doble del 9% observado en invierno (Thompson y Dahl, 2012). Los THI observados en nuestro estudio durante verano fueron 75-83 valores consi-

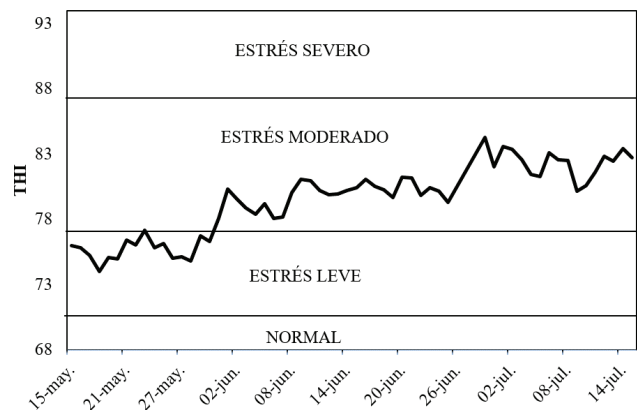


Figura 3. Valores de THI registrados durante la temporada de verano. Promedios basados durante todo el día. Estrés severo >90 , estrés moderado 80-89, estrés leve 72-79, umbral estrés 68-71, y normal <67 .

Figure 3. Summer season recorded THI values. THI values were the mean of the day. Severe stress >90 , moderate stress 80-89, mild stress 72-79, threshold stress <72 and normal <67 .

derados en un estrés calórico moderado, con una prevalencia de mastitis del 65.80%, que fue similar a lo encontrado en otro estudio donde reportaron un fuerte aumento de las incidencias mastitis con el aumento THI para vacas lecheras en climas cálidos en India (Jingar *et al.*, 2014). También en otros autores explicaron que las mayores incidencias de mastitis en condiciones cálidas y húmedas con una multiplicación de portadores de patógenos, como las moscas (Das *et al.*, 2016). Un estudio más reciente, reportó que valores THI ≥ 79 fueron asociados con alta incidencia de mastitis clínica en vacas primíparas y que el mes de Julio fue el que mostró el mayor efecto en la incidencia de mastitis (Vitali *et al.*, 2016). Además, se ha observado un aumento en las incidencias de mastitis, desórdenes puerperales y retención de placenta por efecto de estrés por calor, medido a través de THI (75-80) (Gernand *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

Se encontró una prevalencia alta de mastitis subclínica en el ganado de ordeña que estuvo bajo un estrés calórico moderado y deficiencias de vitaminas E y A durante la época de verano, en la comunidad estudiada. Sin embargo, no se encontró una relación entre la prevalencia de mastitis con respecto a deficiencias de ambas vitaminas E y A. Por otro lado, la ceftriaxona es el antibiótico que resultó menos efectivo, por lo tanto, lo convierte el antibiótico menos recomendado a usarse.

Es de suma importancia emplear un sistema de control para el monitoreo continuo del animal y para ello los productores pueden utilizar para la detección de mastitis subclínica, una prueba de fácil uso y acceso para el productor como es la prueba de California, aunque no tan sensible como la microbiológica, pero puede ayudar a la detección y el seguimiento de esta enfermedad en el ganado bovino. Además, es importante considerar la suplementación de las vitaminas E y A durante el verano donde las temperaturas rebasan los 40°C debido la importancia de estas vitaminas como antioxidante y en el sistema inmune.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se llevó a cabo con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Proyecto 188865 Laboratorio de Innovación para la Producción Inocua de Alimentos en comunidades rurales. Nuestro agradecimiento al M. en C. Rogelio Valle Velázquez† becario de CONACYT y a los estudiantes de Licenciatura Kenia Ituarte y Manuel Santos Bracamonte Mendoza.

REFERENCIAS

- Abuelo, A. y Hernández, J. 2019. Redox Biology in Transition Periods of Dairy Cattle: Role in the Health of Periparturient and Neonatal Animals. *Antioxidants*. 8(1).
- Bedolla, C., Castañeda, V. y Wolter, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). *Revista Electrónica de Veterinaria*. Vol. III (9).
- Blowey, R. W. y Edmondson, P. 2010. *Mastitis Control in Dairy Herds*. 2nd ed. CABI. London, UK.
- Bourne, N., Wathes, D. C., Lawrence, K. E., McGowan, M. y Laven, R. A. 2008. The effect of parenteral supplementation of vitamin E with selenium on the health and productivity of dairy cattle in the UK. *The Veterinary Journal*. 177(3): 381-387.
- Brito, M., Brito, J., Silva, M. y Carmo, R. 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* aisladas de infecção intramamária bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 53: 10-17.
- Collier, R. J., Hall, L. W., Rungruang, S. y Zimbleman, R. B. 2012. Quantifying heat stress and its impact on metabolism and performance. Department of Animal Sciences University of Arizona, 68.
- Damarany, A. I. 2021. Effect of treatment with vitamin E and selenium during late gestation period on mastitis, retained placenta and postpartum reproductive parameters in Egyptian baladi cows. *The Egyptian Society of Animal Production*. 58 (2): 47-56.
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P. y Saikia, J. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary world*. 9: 260.
- De Vlieghe, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S. y Barkema, H. W. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*. 95: 1025-1040.
- Dey, D., Sharma, B., y Mondal, S. 2019. Nutritional Approach to Prevent Mastitis of Dairy Cattle. *Environment and Ecology*. 37(1B): 344-348.
- Duarte, C. M., Freitas, P. P. y Bexiga, R. 2015. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 27: 665-672.
- Fairbrother, J.-H., Dufour, S., Fairbrother, J. M., Francoz, D., Nadeau, É. y Messier, S. 2015. Characterization of persistent and transient *Escherichia coli* isolates recovered from clinical mastitis episodes in dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 176: 126-133.
- Figueroa, J. I. P. G. y Cedeño, J. L. C. B. 2008. Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 9(10):1-34.
- Forbes, B. A. 2009. *Diagnóstico microbiológico*. 12a ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Gerlach, B., Arturo, F., Ayala Alvarez, F., Denogean Ballesteros, F. G., Moreno Medina, S., Gerlach, B. y Ernesto, L. 2009. Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora. *Revista mexicana de agronegocios*. 24: 789-796.
- Gernand, E., König, S. y Kipp, C. 2019. Influence of on-farm measurements for heat stress indicators on dairy cow productivity, female fertility, and health. *Journal of Dairy Science*. 102: 6660-6671.
- Hammami, H., Bormann, J., M'hamdi, N., Montaldo, H. H. y Gengler, N. 2013. Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *Journal of dairy science*. 96: 1844-1855.

- Hess, D., Keller, H., Oberlin, B., Bonfanti, R. y Schüep, W. 1991. Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin-und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition.* 61: 232.
- Hintze, J. 2007. NCSS, PASS and GESS. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, Utah.
- Iuarte Robles, K. y Bracamonte Mendoza, J. 2015. Determinación de la incidencia de mastitis bovina en la región de Cobachi, Sonora, mediante la validación de tres métodos de diagnóstico para su detección: prueba de california, medición de conductividad eléctrica (MAS-D-EC) y cultivo microbiológico. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo.
- Jingar, S., Mehla, R. y Singh, M. 2014. Climatic effects on occurrence of clinical mastitis in different breeds of cows and buffaloes. *Archivos de zootecnia.* 63: 473-482.
- Johansson, B., Persson Waller, K., Jensen, S. K., Lindqvist, H. y Nadeau, E. 2014. Status of vitamins E and A and β -carotene and health in organic dairy cows fed a diet without synthetic vitamins. *Journal of Dairy Science.* 97: 1682-1692.
- Lauridsen, C. y Jensen, S. K. 2005. Influence of supplementation of all-rac-alpha-tocopheryl acetate preweaning and vitamin C postweaning on alpha-tocopherol and immune responses of piglets. *Journal of Animal Science.* 83: 1274-1286.
- LeBlanc, S. J., Herdt, T. H., Seymour, W. M., Duffield, T. F. y Leslie, K. E. 2004. Peripartum Serum Vitamin E, Retinol, and Beta-Carotene in Dairy Cattle and Their Associations with Disease. *Journal of Dairy Science.* 87: 609-619.
- McDougall, S., Hussein, H. y Petrovski, K. 2014. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *New Zealand veterinary journal.* 62: 68-76.
- Morse, D., Delorenzo, M. A., Natzke, R. P. y Bray, D. R. 1987. Factors affecting days of discarded milk due to clinical mastitis and subsequent cost of discarded milk. *Journal of Dairy Science.* 70: 2411-2418.
- National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle: 2001. 7th ed. National Academies Press. Washington, D.C.
- Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, trato humanitario en la movilización de animales. [Consultado 3 Marzo 2020]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4870842&fecha=23/03/1998
- Noro, M. y Barboza, C. S. 2012. Cetosis en rebaños lecheros: presentación y control. *Spei Domus.* 8(17).
- Olivares-Perez, J., Kholif, A. E., Rojas-Hernandez, S., Elghandour, M., Salem, A. Z. M., Bastida, A. Z., Velazquez-Reynoso, D., Cipriano-Salazar, M., Camacho-Diaz, L. M., Alonso-Fresan, M. U. y Dilorenzo, N. 2015. Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of Mexico. *Tropical Animal Health and Production.* 47: 1497-1504.
- Oliver, S. P., Pighetti, G. M. y Almeida, R. A. 2011. Mastitis Pathogens | Environmental Pathogens A2 - Fuquay, John W. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2nd ed. Academic Press. San Diego.
- Omara, S.T. 2017. MIC and MBC of Honey and Gold Nanoparticles against methicillin-resistant (MRSA) and vancomycin-resistant (VRSA) coagulase-positive *S. aureus* isolated from contagious bovine clinical mastitis. *Journal, genetic engineering & biotechnology.* 15: 219-230.
- O'Rourke, D. 2009. Nutrition and udder health in dairy cows: a review. *Irish Veterinary Journal.* 62(4): 1-6.
- Politis, I., Theodorou, G., Lampidonis, A. D., Kominakis, A. y Baldi, A. 2012. Short communication: Oxidative status and incidence of mastitis relative to blood α -tocopherol concentrations in the postpartum period in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 95: 7331-7335.
- Rezamand, P., Hoagland, T. A., Moyes, K. M., Silbart, L. K. y Andrew, S. M. 2007. Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient Holstein and Jersey dairy cows with or without subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science.* 90: 5097-107.
- Ruiz, A., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R., Elizabeth, S., Lucena, E. y Benone, S. 2011. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Revista de Salud Animal.* 33: 57-64.
- Smith, K. L., Hogan, J. y Weiss, W. 1997. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *Journal of Animal Science.* 75: 1659-1665.
- Sordillo, L. M. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *Journal of Dairy Science.* 99: 4967-4982.
- Srednik, M. E., Grieben, M. A., Bentancor, A. y Gentilini, E. R. 2015. Molecular identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis and detection of beta-lactam resistance. *Journal of Infection in Developing Countries.* 9: 1022-1027.
- Strickland, J. M., Wisnieski, L., Herdt, T. H. y Sordillo, L. M. 2021. Serum retinol, β -carotene, and α -tocopherol as biomarkers for disease risk and milk production in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 104(1): 915-927.
- Thompson, I. y Dahl, G. 2012. Dry-period seasonal effects on the subsequent lactation. *The Professional Animal Scientist,* 28, 628-631.
- Vitali, A., Bernabucci, U., Nardone, A. y Lacetera, N. 2016. Effect of season, month and temperature humidity index on the occurrence of clinical mastitis in dairy heifers. *Advances in Animal Biosciences.* 7: 250-252.
- Waller, K. P., Sandgren, C. H., Emanuelson, U. y Jensen, S. K. 2007. Supplementation of RRR- α -tocopheryl acetate to periparturient dairy cows in commercial herds with high mastitis incidence. *Journal of Dairy Science.* 90: 3640-3646.
- Yildiz, H., Kayguzoğlu, E. y Kizil, Ö. 2005. Concentrations of serum vitamins A, E and C and β -carotene during pregnancy in cows. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.* 49: 199-202.
- Zuluaga, J. J. E., Jaramillo, M. G. y Betancur, L. F. R. 2010. Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. *Revista Lasallista de investigación.* 7: 49-57.

Efecto de diferentes relaciones de luz azul:roja en el crecimiento de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Effect of different blue:red light ratios on habanero pepper seedlings (*Capsicum chinense* Jacq.) growth

Mendoza-Paredes J.E^{1*}, Castillo-González A.M¹, Valdéz-Aguilar L.A², Avitia-García E¹, García-Mateos M.R¹

¹ Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. CP. 56230, Texcoco de Mora, Estado de México, México.

² Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923. CP. 25315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

RESUMEN

El chile habanero es una de las especies hortícolas de mayor importancia en la península de Yucatán y la producción de plántula es la parte crucial inicial para una producción exitosa de frutos. Estas se podrían cultivar en ambiente controlado con iluminación LED y permitiría producirse en cualquier época del año libres de plagas y enfermedades. Los objetivos fueron evaluar el efecto de diferentes proporciones de luz LED azul(A):roja(R) (A0%, A34.5%:R65.5%, A57.1%:R42.9%, A76%:R24%, A:100%) y un testigo fluorescente sobre crecimiento de planta y concentración de pigmentos fotosintéticos en plántulas de chile habanero 'Mayan Ba'alché' bajo condiciones controladas de crecimiento. Los resultados mostraron que el testigo promovió el crecimiento de la hoja, a través de una mayor área foliar, índice de área foliar, área foliar específica, peso fresco de hoja y con una menor frecuencia estomática y diámetro de tallo, mientras el tratamiento A100% promovió el crecimiento del tallo, a través de una mayor altura de planta, distancia de entrenudos y peso fresco de tallo. Los tratamientos A34.5%:R65.5%, A57.1%:R42.9%, A76%:R24% indujeron un efecto negativo en altura de plántula, distancia de entrenudos y peso fresco de tallo. Los tratamientos no tuvieron efecto en peso seco de parte aérea ni en pigmentos fotosintéticos.

Palabras clave: Luz LED, luz fluorescente, concentración de pigmentos fotosintéticos, ambiente controlado

ABSTRACT

Habanero pepper is one of the most important horticultural species in the Yucatan peninsula, and the seedling production is the crucial initial part for successful fruit production. These could be grown under controlled environment with LED lighting and would allow them to be produced all year-round, free of pests and diseases. The objectives were to evaluate the effects of different blue(A):red(R) LED light ratios (A0%, A34.5%:R65.5%, A57.1%:R42.9%, A76%:R24%, A:100%) and a fluorescent control on plant growth and photosynthetic pigments concentration of habanero pepper seedlings 'Mayan Ba'alché' grown under controlled conditions. The results showed that control promoted leaf growth, through a greater leaf area, leaf area index, specific leaf area, leaf fresh weight and with a lower stomatal frequency and stem

diameter, while A100 % treatment promoted stem growth, through greater plant height, internode distance and stem fresh weight. Treatments A34.5%:R65.5%, A57.1%:R42.9%, A76%:R24% induced a negative effect in seedling height, internode distance and stem fresh weight. The treatments had no effect on dry weight of aerial part or in photosynthetic pigments.

Key words: LED light, fluorescent light, photosynthetic pigments concentration, controlled environment.

INTRODUCCIÓN

El chile habanero es una planta anual de 30 a 120 cm de altura, de tipo arbusto (Lim, 2013), es nativa de las tierras bajas de la cuenca amazónica, de donde se dispersó en la época prehispánica a Perú, a la cuenca del Orinoco, las Antillas y finalmente arribó a la Península de Yucatán (Trujillo, 2018). Es una de las especies hortícolas de mayor importancia de la península de Yucatán (Ruiz-Lau *et al.*, 2011; Castillo-Aguilar *et al.*, 2015) y obtuvo la denominación de origen en esta región en 2010 (CICY, 2016). El chile habanero posee diversas propiedades nutraceuticas, medicinales, e industriales, lo que lo hace tener una alta demanda en el mercado nacional e internacional (Adame-García *et al.*, 2021; Lim, 2013).

La producción de plántula de chile habanero es la parte crucial inicial para una posterior producción exitosa de frutos, es la etapa donde más vulnerable es a plagas, enfermedades y variaciones de condiciones ambientales, y tiene un periodo que abarca de los 40 a 50 días después de la siembra (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015).

Un sistema de producción con el cual se puede obtener plántulas de manera más uniforme y libre de riesgos ambientales, biológicos y/o nutricionales es el uso de la agricultura vertical en ambiente controlado con iluminación LED, este un sistema de producción agrícola cerrado y aislado del ambiente circundante mediante el uso de estructuras sólidas y herméticas, adicionalmente se utiliza una fuente de iluminación LED en sustitución de la luz solar para el crecimiento de las plantas y un sistema de aire acondicionado, donde en conjunto se puede controlar, establecer y monitorear todas las variables ambientales, nutricionales y de riego necesarias en una planta a través de un equipo eléctrico-mecánico controlado por software especializado y en el cual las plan-

*Autor para correspondencia: Jorge Enrique Mendoza Paredes
Correo electrónico: jmenpar07@outlook.com

Recibido: 7 de abril de 2021

Aceptado: 26 de diciembre de 2021

tas se colocan para su crecimiento en una estructura tipo anaquel con múltiples niveles, con lo cual se logra tener un aumento de producción basado en el número de niveles que se utilicen en una superficie determinada (Kozai y Niu, 2016; Mendoza-Paredes *et al.*, 2021b).

La producción en este sistema permite obtener plántulas fisiológica y morfológicamente uniformes a pesar de las condiciones climáticas de la región (Kozai *et al.*, 2016), además no se presenta estacionalidad en la producción del cultivo y en consecuencia puede ser producida en cualquier época del año (Mendoza-Paredes *et al.*, 2021a). Adicionalmente, se puede acortar el periodo de producción de plántulas entre un 30 % a 40 % en comparación con las que se producen en condiciones de invernadero con alta tecnología en control de variables ambientales, nutrición mineral, plagas y enfermedades (Kozai *et al.*, 2016).

Las plántulas producidas de esta manera se encuentran libres de plagas y enfermedades (Kozai *et al.*, 2016), por lo tanto, no se necesita la aplicación de ningún tipo de producto de prevención y/o control de estas (Mendoza-Paredes *et al.*, 2021a).

La producción de plántula de chile habanero es idónea para cultivarse con agricultura vertical en ambiente controlado con iluminación LED (Kozai y Niu, 2016), ya que además la plántula de chile habanero tiene un ciclo corto de crecimiento y posee un porte relativamente pequeño (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015).

Actualmente no existe investigación de esta especie en condiciones controladas de crecimiento con luz LED. Se reportan investigaciones en condiciones similares con plántulas de tomate (Hernández *et al.*, 2016; Kim y Hwang, 2019; Liu *et al.*, 2018; Wollaeger y Runkle, 2015) y en plántula de pepino por Hernández y Kubota (2016), donde cada investigación se obtuvieron efectos diferentes para cada especie y variedad en relación a diferentes proporciones de luz LED roja y azul.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes proporciones de luz LED roja y azul sobre crecimiento y concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas de plántula de chile habanero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germinación

Se utilizaron semillas de chile habanero 'Mayan Ba'alché' del CICY, las cuales se sembraron en charolas, con un tamaño de cavidad de 3.1 cm x 3.1 cm (base superior), 6.0 cm (altura), 2.1 cm x 2.1 cm (base inferior) y 23 mL (volumen), una semilla por cavidad a una profundidad de 1 cm en una mezcla de turba:perlita (3:1) [turba rubia (Pro mix®) y perlita (Agrolita®)], las cuales se cortaron para tener 80 cavidades (4 filas x 20 columnas). Una vez sembradas las semillas, las charolas se colocaron en condiciones de laboratorio donde tuvieron luz solar incidente durante el día y fueron regadas con agua potable (pH 7.1 y CE 0.42 dS m⁻¹). La temperatura ambiental (día 25.8±0.2 °C/noche 22.6±0.1 °C) y la humedad relativa (día 51.5±0.6 %/noche 58.6±0.6 %), se registraron

con un datalogger Extech instruments® modelo RH10. A los 12 días después de la emergencia bajo estas condiciones, se llevaron a una cámara de crecimiento para iniciar los tratamientos.

Cámara y gabinetes de crecimiento

Se realizó una adaptación de una cámara de crecimiento a partir de un cuarto frío usado (TORREY®, MEX), con medidas interiores de 2.76 m x 2.76 m x 1.90 m (ancho, largo y altura), las modificaciones internas de la cámara de crecimiento se basó en el diseño de Katagiri *et al.* (2015), con las cuales se reguló la temperatura ambiental y la humedad relativa a través de un aire acondicionado portátil (LG® modelo LP1017WSR 10200 BTU, KOR) y un deshumidificador (Whirlpool® modelo WAD200 5Q 20L/24 h, USA) los cuales se colocaron dentro de la cámara de crecimiento.

Se diseñaron seis gabinetes de crecimiento con la finalidad de mantener aislados los tratamientos de luz. Éstos se construyeron a partir de un anaquel metálico (0.3 m de ancho x 0.85 m de largo x 1.45 m de altura), al cual se le añadieron paredes de placas de unicel de 2 cm de grosor, forradas con papel aluminio, con la finalidad de tener un máximo de reflexión de la luz en su interior.

Tratamientos con diferentes proporciones de luz LED roja y azul

Las lámparas que se utilizaron fueron hechas a mano y estuvieron compuestas por perfiles de aluminio (5 cm de ancho x 85 cm de largo) que sirvieron como base de anclaje las lámparas LED y las lámparas fluorescentes; que se colocaron en la base superior de cada uno de los gabinetes de crecimiento. Se utilizaron dos perfiles por tratamiento (12 lámparas LED por perfil), excepto para el testigo, donde se usaron cuatro perfiles (1 lámpara fluorescente por perfil) (Tabla 1).

Los tratamientos de luz que se utilizaron consistieron en diferentes proporciones de luz azul y roja y un testigo con luz fluorescente. Se utilizaron para el tratamiento A0 %: A100 % (A0) 24 lámparas rojas, A34.5 %:R65.5% (A34.5) 6 azules y 18 lámparas rojas, A57.1 %:R45.9 % (A57.1) 12 lámparas azules y 12 lámparas rojas, A76 %:R24% (A76) 18 lámparas azules y 6 rojas, A100 %:R0 % (A100) 24 lámparas azules. La densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y las propiedades del espectro electromagnético de los tratamientos se midió con un espectroradiómetro (Apogee instruments® modelo SS-110, EUA) y se tomaron 330 mediciones en el área de cultivo (66 cm x 20 cm= 1320 cm²) para verificar que los tratamientos tuvieran la misma densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) (Tabla 1).

Se realizó un análisis estadístico de las variables físicas de los tratamientos para asegurar que las intensidades de luz entre tratamientos LED fueran iguales y las proporciones de luz azul y roja fueran diferentes; además de verificar el pico de longitud de onda (nm) e intervalo de la luz LED presente en los tratamientos. Se estableció un fotoperiodo para todos los tratamientos de luz de 15 h por día durante 35 días.

Tabla 1. Propiedades físicas de los tratamientos con diferentes proporciones de luz LED azul y roja en plántula de chile habanero cultivado bajo condiciones controladas.

Table 1. Physical properties of treatments with different ratios of blue and red LED light on habanero pepper seedling grown under controlled conditions.

| | Tratamientos | | | | | |
|------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | FL | A0 | A34.5 | A57.1 | A76.0 | A100 |
| PrA | Testigo | A0 % | A34.5 % | A57.1 % | A76 % | A100 % |
| PrR | Testigo | R100 % | R65.5 % | R42.9 % | R24 % | R0 % |
| Dtot | 119.1±0.6 b ^x | 241.5±3.1 a | 241.4±3.3 a | 244.4±2.4 a | 241.4±1.8 a | 243.8±2.5 a |
| LID | 6.4±0.0 b | 13.0±0.2 a | 13.0±0.2 a | 13.2±0.1 a | 13.0±0.1 a | 13.2±0.1 a |
| λA | - | - | 457±0 b | 457±0 a | 457±0 b | 457±0 b |
| %DA | - | - | 34.5±0.6 d | 57.1±0.3 c | 76.0±0.3 b | 100.0±0.0 a |
| λR | - | 636±0 b | 635±0 c | 637±0 a | 636±0 b | - |
| %DR | - | 100.0±0.0 a | 65.5±0.6 b | 42.9±0.3 c | 24.0±0.3 d | - |

^xMedias con letras iguales en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). FL= fluorescente con un intervalo de 416nm – 715nm (testigo); A= Luz LED azul; R= Luz LED roja; PrA= Proporción luz azul; PrR= Proporción luz roja; Dtot= Densidad de flujo de fotones fotosintéticos total de tratamiento ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); LID= Luz integral diaria ($\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$); λA= Pico de longitud de onda (nm) color azul; %DA= Porcentaje de densidad de flujo de fotones fotosintéticos de luz azul (%); λR= Pico de longitud de onda (nm) color rojo; %DR= Porcentaje de densidad de flujo de fotones fotosintéticos de luz roja (%).

Condiciones de crecimiento en la cámara de crecimiento

Diecisiete días después de la siembra, las charolas con las plántulas se colocaron (una charola por tratamiento) dentro de los gabinetes de crecimiento. Las charolas se regaron diariamente con 300 mL de la solución Hoagland modificada a 1/5 de su concentración (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014) con pH de 6.8 y CE de 1.35 dS cm^{-1} , donde se abastecieron los macronutrientes de la forma siguiente: 1.2 mM KNO_3 , 0.8 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.2 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM MgSO_4 y los micronutrientes se abastecieron con la mezcla Tradecorp® AZ (0.065g L^{-1}).

La temperatura ambiente promedio (día 28.2±0.1 °C/noche 25.3±0.1 °C) y la humedad relativa promedio (día 56.2±0.5 %/noche 77.1±0.5 %) se registraron cada minuto con el promedio de los registros de tres datalogger (Extech instruments® modelo RH10, USA), ubicados a nivel de copa de la planta, dentro de tres gabinetes seleccionados. La temperatura promedio de la solución nutritiva se midió con un termómetro infrarrojo (Extech instruments® modelo 42530, USA) y fue de 26.1±0.2 °C. La concentración promedio de CO_2 se midió con un medidor portátil de CO_2 ambiental (Extech instruments® modelo CO250, USA) y fue de 397±53 ppm.

Variables de crecimiento de la parte aérea

Después de 35 días con los tratamientos de luz LED, las plántulas se cosecharon y se determinó de la parte aérea:

la altura de planta (cm), número de hojas por planta, grosor de tallo (mm) con un vernier digital (Truper®, MEX), área foliar (cm^2 por planta) con un integrador de área foliar LI-3100 (LICOR®, USA), se calculó el índice de área foliar [área foliar (cm^2)/área de cultivo (cm^2)], el área foliar específica [área foliar (cm^2)/peso seco hoja (g)], distancia de entrenudos (cm) que se obtuvo del cociente de la altura de planta y el número de hojas.

Además, se determinó el peso fresco de tallo (g por planta) y peso fresco de hoja (g por planta) con una balanza de precisión (Ohaus® Scout Pro, USA), el peso fresco de la parte aérea (g por planta) se obtuvo la suma del peso fresco de tallo y hoja.

Posteriormente, la parte aérea se secó en una estufa de aire forzado (BINDER® modelo FED 115, DEU) por 48 horas a 70 °C y se registró el peso seco de tallo (g por planta) y peso seco de hoja (g por planta) con una balanza de precisión (Ohaus® Golden series, USA). El peso seco de la parte aérea (g planta^{-1}) se obtuvo de la suma del peso seco del tallo y de la hoja.

La frecuencia estomática (número de estomas mm^2) se obtuvo aplicando barniz transparente de uñas en el envés de la hoja, para posteriormente despegar esta calca y contabilizar la cantidad de estomas por campo del microscopio (Carl Zeiss® Axiostar, DEU) con un aumento de 40X. En cada una de las variables medidas se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento, con excepción de la frecuencia estomática donde se utilizaron 10 repeticiones.

Concentración de pigmentos fotosintéticos en hoja

Las concentraciones de clorofila a, b y total (mg g^{-1} de peso fresco), proporción de clorofila a/b y concentración de carotenoides (mg g^{-1} de peso fresco) se determinaron mediante la metodología descrita por la AOAC (1980). Estas variables se determinaron en hojas fuente (de reciente maduración), completamente desarrolladas, recién cortadas y utilizando tres hojas por plántula, se utilizaron nueve repeticiones por tratamiento, donde cada repetición fue una plántula.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar, una repetición estuvo constituida por una plántula. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$) mediante el programa SAS V9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables de crecimiento de la parte aérea

Los resultados de las variables de crecimiento se muestran en la Tabla 2. Las plántulas del tratamiento que recibieron 100 % de luz azul, presentaron la mayor altura de plántula y distancia de entrenudos respecto al resto de tratamientos luz LED y al testigo; por otra parte, la presencia de diferentes porcentajes de luz azul y roja al mismo tiempo en los tratamientos evaluados (A34.5, A57.1 y A76.0) junto

Tabla 2. Variables de crecimiento evaluadas en plántula de chile habanero cultivado bajo condiciones controladas con diferentes proporciones de luz LED azul y roja.

Table 2. Growth variables evaluated in habanero pepper seedling grown under controlled conditions with different ratios of blue and red LED light.

| Var | Tratamientos | | | | | |
|-----|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | FL | A0 | A34.5 | A57.1 | A76.0 | A100 |
| AP | 7.05 ±0.29 c ^x | 9.94 ±0.34 b | 6.81 ±0.15 cd | 6.48 ±0.15 cd | 5.97 ±0.21 d | 13.55 ±0.30 a |
| DE | 0.70 ±0.04 c | 1.10 ±0.04 b | 0.70 ±0.02 c | 0.65 ±0.02 c | 0.59 ±0.02 c | 1.45 ±0.04 a |
| DT | 0.24 ±0.01 c | 0.29 ±0.01 a | 0.27 ±0.01 ab | 0.29 ±0.01 ab | 0.28 ±0.01 ab | 0.27 ±0.00 b |
| NH | 10.4 ±0.37 a | 9.25 ±0.25 b | 9.80 ±0.21 ab | 10.1 ±0.23 ab | 10.15 ±0.23 ab | 9.45 ±0.23 ab |
| AF | 85.05 ±4.59 a | 68.78 ±3.11 b | 58.29 ±2.45 bc | 50.16 ±1.48 c | 61.33 ±1.54 bc | 60.24 ±2.74 bc |
| IAF | 5.15 ±0.28 a | 4.17 ±0.19 b | 3.54 ±0.15 bc | 3.04 ±0.09 c | 3.72 ±0.09 bc | 3.64 ±0.17 bc |
| AFE | 566.50 ±15.5 a | 452.71 ±18.51 b | 376.14 ±19.0 cd | 325.70 ±12.4 d | 415.48 ±16.9 bc | 449.51 ±10.2 b |
| FE | 86.60 ±4.28 d | 153.60 ±6.09 c | 239.60 ±5.34 a | 189.90 ±6.20 b | 149.80 ±4.07 c | 165.40 ±8.34 bc |

*Medias ± DE con igual letra en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). ns= No significativo; Var= Variables; FL= fluorescente (testigo); AP= Altura de planta (cm); DE= Distancia entrenudos (cm); DT= Diámetro de tallo (cm); NH= Número de hojas; AF= Área foliar (cm² por planta); IAF= Índice de área foliar; AFE= Área foliar específica (cm² g⁻¹); FE= Frecuencia estomática (número de estomas mm²).

con el testigo, generó las menores alturas y distancia de entrenudos en plántula en comparación con los tratamientos monocromáticos rojo (A0) y azul (A100) (Tabla 2). El diámetro de tallo fue mayor en plantas que recibieron tratamientos con luz LED respecto al testigo, y las plantas que tuvieron 0 % de luz azul generó un mayor diámetro de tallo respecto a las plantas que recibieron 100 % de luz azul (Tabla 2). Aunque no hubo efectos significativos en el número de hojas entre los tratamientos de luz LED, las plantas del testigo resultaron con un número de hojas mayor que las plantas que recibieron 0 % de luz azul (Tabla 2). Las plantas del testigo obtuvieron un área foliar, índice de área foliar y área foliar específica mayor en comparación con los diversos tratamientos con luz LED, además las plantas del tratamiento A57.1 tuvieron una menor área foliar e índice de área foliar en relación con las que recibieron 0 % de luz azul; de manera similar el área foliar específica fue menor en las plantas del tratamiento A57.1 en comparación con las que recibieron 0 % y 100 % de luz azul (Tabla 2). La frecuencia estomática fue mayor en plantas que recibieron un 34.5 % de luz azul en comparación con las plantas del testigo y con el resto de tratamientos con luz LED (Tabla 2).

Verma *et al.* (2018) encontraron en plantas de *Digitalis purpurea* resultados parecidos a los del presente estudio respecto a la altura de planta en donde nosotros usamos tratamientos similares a los de ellos, mientras que lo que registraron Hernández y Kubota (2016) en plántula de pepino,

difiere con lo que se obtuvo en chile habanero, ya que sus resultados se ajustaron a una regresión lineal en donde a mayor porcentaje de luz azul respecto a luz roja la altura de plántula disminuyó, mientras que en plántula de tomate, Kim y Hwang (2019) no encontraron efectos en altura de plántula al usar 0 %, 30 %, 50 %, 70 %, 100 % de luz azul respecto a luz roja y un testigo de luz fluorescente.

Las menores alturas de plántula y distancia de entrenudos que se registraron en los tratamientos A34.5, A57.1 y A76.0, pudo deberse a la existencia de un efecto negativo que tuvieron las plántulas que recibieron luz azul y roja al mismo tiempo, en comparación con los tratamientos monocromáticos A0 y A100 (Tabla 2). El efecto negativo pudo darse entre los fotorreceptores fitocromo (asociado a luz roja) y los criptocromos, fototropinas y zeitlupe (asociados a luz azul), ya que al formar parte del sistema de fotorregulación de señalización intercelular con segundos mensajeros, pudo haber alterado el transporte, activación y síntesis hormonal; además de la activación y expresión de genes, entre otros procesos, ya que los fotorreceptores regulan y contribuyen en diversos procesos fisiológicos de manera redundante o sinérgica (Berkovich *et al.*, 2017; Demotes-Mainard *et al.*, 2016).

Las plantas que recibieron solo 100 % de luz azul, tuvieron un comportamiento opuesto a lo asociado a la luz azul, la cual tiende a reducir la altura de planta a través del control sobre la expansión celular y la reducción de la extensibilidad de la pared celular (Huché-Thélier *et al.*, 2016); dado que, por el contrario, la luz roja promueve una estimulación activa del fotorreceptor fitocromo el cual está asociado en promover una mayor altura de planta mediante la elongación del tallo (Pocock, 2015) y por consiguiente la distancia de entrenudos. El efecto asociado a la luz roja en las plántulas de habanero se observó de manera parcial, ya que las que recibieron solo luz roja (A0) tuvieron una mayor altura de plántula y distancia de entrenudos que las que recibieron luz azul y roja al mismo tiempo junto con el tratamiento fluorescente, pero con menores valores que las que recibieron 100 % de luz azul (Tabla 2).

La baja altura de plántula y distancia de entrenudos que se encontró en el tratamiento fluorescente en comparación con las plantas que recibieron 0 % y 100 % de luz azul pudo deberse a que el testigo tuvo la mitad de la LID (luz integral diaria) que el resto de los tratamientos LED (Tabla 1).

Kim y Hwang (2019) y Hernández *et al.* (2016) encontraron en plántulas de tomate resultados diferentes en el diámetro de tallo en comparación con los de chile habanero; respecto a los resultados de Kim y Hwang (2019), los tratamientos con diferentes porcentajes de luz azul y roja junto con un testigo de luz fluorescente no tuvieron efectos, mientras que lo que registraron Hernández *et al.* (2016) fue que 50 % de luz azul respecto a luz roja presentó el mayor diámetro de tallo en comparación con las que recibieron 0 % y 100 % de luz azul que fueron las que menor diámetro de tallo presentaron.

De una manera similar que se describió en altura de plántula y distancia de entrenudos, el diámetro de tallo fue

menor cuando recibieron luz fluorescente lo más probable que debido a que el testigo tuvo la mitad de la LID (Tabla 1) que el resto de los tratamientos LED, trajo consigo una disminución del diámetro de tallo respecto al resto de tratamientos con luz LED.

Las plántulas del testigo fluorescente presentaron de manera general un efecto directo y constante en el crecimiento bajo este tratamiento, debido a que la LID (luz integral diaria) necesaria para la producción de plántula en ambiente controlado es de $13 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Kubota, 2016), sin embargo el testigo fluorescente solo aportó ($6.4 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Tabla 1), lo cual es inferior y por debajo de la mitad de lo necesario, mientras que en los tratamientos con luz LED tuvieron una LID entre 13.0 y $13.2 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Tabla 1), los cuales se encuentran dentro del valor necesario para la producción de plántula según lo mencionado por Kubota (2016) que es de $13 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

A causa de lo anterior, las plantas del tratamiento testigo presentaron una adaptación a baja intensidad luminosa y las características que poseen las plantas con esta adaptación, típicamente tienen una baja tasa fotosintética, pero poseen mayor eficiencia de captura y uso de la energía de la luz, usualmente a través del incremento en la concentración de clorofila y una disminución de la relación clorofila a/b, mientras que las plantas adaptadas a ambientes con mayor intensidad luminosa poseen puntos de saturación de luz más altos respecto a la tasa fotosintética neta, debido a que poseen en el proceso de la fotosíntesis una cadena de transporte de electrones más eficiente y una mayor concentración de enzimas para la carboxilación (Qiansheng *et al.*, 2014), además de que se lleva a desarrollar hojas más grandes de menor grosor y baja frecuencia estomática (Stanton *et al.*, 2010), con el objetivo de tener un área foliar suficiente para que se pueda llevar a cabo de la mejor manera el proceso fotosíntesis, fijación de CO_2 y acumulación de almidón (Tsukaya, 2005). Estas características de adaptación también se observaron en el experimento relacionado a los resultados de las variables evaluadas asociadas con el órgano de la hoja, como es el caso de número de hojas, área foliar, índice de área foliar, área foliar específica, frecuencia estomática y peso fresco de hoja (Tabla 2 y 3).

Hernández y Kubota (2016) encontraron en plántulas de pepino resultados similares en el número de hojas, ya que no existieron resultados estadísticamente significativos cuando se utilizó tratamientos con diferentes proporciones de luz azul y roja. Por otro lado, en plantas de *Digitalis purpurea* Verma *et al.* (2018) hallaron que cuando estas recibieron 20 % de luz azul respecto a luz roja tuvieron mayor número de hojas que las que recibieron 0 %, 50 %, 80 % y 100 % de luz azul junto con las del testigo de luz fluorescente. De manera diferente a los resultados del presente estudio en chile habanero, en plántulas de tomate Kim y Hwang (2019) encontraron que las que tuvieron 30 % de luz azul presentaron mayor número de hojas en comparación con las del testigo fluorescente y con las que tuvieron 50 %, 70 % y 100 % de luz azul respecto a luz roja.

Tabla 3. Peso fresco y seco evaluado en plántula de chile habanero cultivado bajo condiciones controladas con diferentes proporciones de luz LED azul y roja.

Table 3. Fresh and dry weight evaluated in habanero pepper seedling, grown under controlled conditions with different ratios of blue and red LED light.

| Var | Tratamientos | | | | | |
|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | FL | A0 | A34.5 | A57.1 | A76.0 | A100 |
| PFT | 0.26 ±0.02 c | 0.52 ±0.03 b | 0.29 ±0.02 c | 0.32 ±0.02 c | 0.32 ±0.02 c | 0.62 ±0.02 a |
| PFH | 1.62 ±0.08 a | 1.40 ±0.07 ab | 1.34 ±0.05 b | 1.23 ±0.04 b | 1.45 ±0.04 ab | 1.30 ±0.05 b |
| PFA | 1.92 ±0.09 a | 1.92 ±0.08 a | 1.63 ±0.05 bc | 1.56 ±0.05 c | 1.78 ±0.05 abc | 1.88 ±0.07 a |
| PST | 0.03 ±0.00 d | 0.08 ±0.01 ab | 0.06 ±0.01 bc | 0.06 ±0.00 c | 0.05 ±0.01 cd | 0.09 ±0.00 a |
| PSH | 0.15 ±0.01 ns | 0.16 ±0.01 ns | 0.16 ±0.01 ns | 0.16 ±0.01 ns | 0.15 ±0.01 ns | 0.13 ±0.01 ns |
| PSA | 0.19 ±0.01 ns | 0.23 ±0.01 ns | 0.22 ±0.01 ns | 0.21 ±0.01 ns | 0.20 ±0.01 ns | 0.23 ±0.01 ns |

*Medias ± DE con igual letra en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). ns= No significativo; Var= Variables; FL= fluorescente (testigo); PFT= Peso fresco de tallo (g por planta); PFH= Peso fresco de hoja (g por planta); PFA= Peso fresco de la parte aérea (g por planta); PST= Peso seco de tallo (g por planta); PSH= Peso seco de hoja (g por planta); PSA= Peso seco de la parte aérea (g por planta).

El número de hojas se promovió en mayor proporción en plantas que recibieron luz fluorescente, a pesar de que tuvieron la mitad de la LID (Tabla 1); estas tuvieron estadísticamente el mismo número de hojas que los tratamientos con luz LED e inclusive tuvieron mayor cantidad de hojas que el tratamiento A0, lo anterior pudo deberse a causa de un mecanismo de adaptación a baja intensidad luminosa por parte de la planta (Qiansheng *et al.*, 2014; Stanton *et al.*, 2010; Tsukaya, 2005). Entre los tratamientos con luz LED, esta especie no es tan susceptible a modificar su número de hojas con base en una cierta proporción de luz azul o roja.

En plántulas de tomate se encontró, por parte de Kim y Hwang (2019), un comportamiento diferente en el área foliar, ya que las que recibieron 0 % y 100 % de luz azul respecto a luz roja tuvieron menor área foliar que las que recibieron 30 % y 70 % de luz azul al igual que las de un tratamiento testigo fluorescente. De manera similar a los anteriores autores, Hernández *et al.* (2016) registraron en plántulas de tomate que tanto las que recibieron 0 % y 100 % de luz azul respecto a roja tuvieron la menor área foliar en comparación con las que tuvieron 10 %, 30 %, 50 %, 75 % de luz azul y también con el testigo fluorescente. Por otro lado, los resultados encontrados en área foliar de plántulas de pepino por Hernández y Kubota (2016) se ajustaron a una regresión lineal en donde a mayor porcentaje de luz azul respecto a luz roja el área foliar disminuyó.

La mayor área foliar que se presentó en las plantas que crecieron bajo luz fluorescente (Tabla 2), esto pudo deberse a un mecanismo de adaptación de las plántulas a un entorno de baja intensidad luminosa (Qiansheng *et al.*, 2014) que se presentó con la luz fluorescente lo que condujo un mayor de-

sarrollo en el tamaño de las hojas (Stanton *et al.*, 2010), para así obtener área foliar suficiente para poder llevar a cabo de manera correcta el proceso de la fotosíntesis (Tsukaya, 2005).

El comportamiento entre los tratamientos de luz LED evaluados en plántulas de chile habanero, pudo ser inherente al tipo de luz y la especie, ya que la luz azul puede incrementar o disminuir el área foliar y en algunas especies no tiene ningún efecto (Huché-Théliér *et al.*, 2016), mientras la luz roja puede incrementar o disminuir el área foliar dependiendo de la biología de la planta (Berkovich *et al.*, 2017).

El índice de área foliar, en plántulas con tratamientos de luz LED, estuvieron dentro del intervalo de 3.0 a 4.0 (Tabla 2), con lo cual existió una intercepción de luz de un 90 % a 100 %, mientras que en el testigo al haber sido < 4.0 (Tabla 2), las hojas más bajas de la planta se encontraron muy sombreadas y no recibieron suficiente luz incidente, lo que pudo haber generado una pérdida de fotosíntesis a través de una mayor respiración (Yamori, 2016). El comportamiento del índice de área foliar en plántulas con el tratamiento fluorescente, fue el mismo que se presentó en la variable de área foliar, en donde debido a una adaptación a una baja intensidad luminosa (Qiansheng *et al.*, 2014) que se presentó con las plántulas del tratamiento fluorescente, se ocasionó a desarrollar hojas más grandes (Stanton *et al.*, 2010), con el objetivo de tener un área foliar suficiente para que se pueda llevar a cabo de la mejor manera el proceso fotosíntesis (Tsukaya, 2005).

Agarwal *et al.* (2018) encontraron un comportamiento parecido a los del presente estudio en plantas de espinaca, en donde las que recibieron 0 % y 100 % de luz azul respecto a luz roja tuvieron mayor área foliar específica que las de 25 %, 50 % y 75 % de luz azul.

El área foliar específica (AFE) es una medida indirecta del grosor de la hoja en una planta (Amanullah, 2015), lo cual se traduce en que a una mayor AFE menor grosor de hoja y viceversa. El menor grosor de hoja (AFE) se obtuvo en las plantas del testigo (Tabla 2), se debió a una adaptación a una baja intensidad luminosa, que llevó a desarrollar hojas más grandes de menor grosor y baja frecuencia estomática (Stanton *et al.*, 2010), con el objetivo de tener un área foliar suficiente para que se pueda llevar a cabo de la mejor manera el proceso fotosíntesis, fijación de CO₂ y acumulación de almidón (Tsukaya, 2005).

Entre diferentes tipos de luces monocromáticas, se ha visto que la luz azul promueve más el grosor de la hoja que la luz roja, verde o combinaciones con altos porcentajes de luz azul (Huché-Théliér *et al.*, 2016). Este comportamiento difiere a lo observado en plántulas de chile habanero con diferentes tratamientos de luz azul y roja LED, lo cual pudo deberse a un proceso de aclimatación inherente a la especie al espectro de luz incidente (Berkovich *et al.*, 2017).

Shengxin *et al.* (2016) encontraron en plántulas de colza que diferentes tratamientos con luz azul y roja LED no tuvieron ningún efecto en la frecuencia estomática. Por otra parte, en plantas de *Digitalis purpurea* que recibieron porcentajes de 0 %, 20 %, 50 %, 80 % y 100 % de luz azul respecto a luz roja los resultados de la frecuencia estomática

fueron estadísticamente iguales entre estos, sin embargo, las plantas del testigo fluorescente tuvieron mayor frecuencia estomática que las que recibieron 50 % de luz azul (Verma *et al.*, 2018).

Las plantas adaptadas a una baja intensidad luminosa tienden a tener una baja frecuencia estomática (Stanton *et al.*, 2010), lo cual sucedió en las plántulas del testigo fluorescente al tener la mitad de la LID respecto a los tratamientos con luz LED (Tabla 1). Por otro lado, se ha observado que la luz monocromática azul tiende a incrementar la frecuencia estomática en comparación con luz monocromática roja o verde (Huché-Théliér *et al.*, 2016), sin embargo, en chile habanero se puede concluir que un 34.5% de luz azul indujo la mayor frecuencia estomática.

Los resultados de las variables de peso fresco evaluado en plántula se muestran en el Tabla 3. El peso fresco de tallo fue mayor en plantas que tuvieron el 100 % de luz azul respecto al resto de plantas con diferentes tratamientos con luz LED y las plantas del testigo (Tabla 3). A pesar de que no existió diferencias estadísticas en el peso fresco de hoja en las plantas que recibieron los diferentes tratamientos LED, las plantas del testigo tuvieron el mayor peso fresco de hoja en comparación con las que recibieron 34.5 %, 57.1 % y 100% de luz azul (Tabla 3). El peso fresco de la parte aérea fue mayor para las plantas que recibieron 0% y 100 % de luz azul, así como para el testigo en relación con las que recibieron 34.5 % y 57.1% de luz azul (Tabla 3). Las plantas que recibieron luz azul al 100 % mostraron el mayor peso seco de tallo en comparación con las que recibieron 34.5 %, 57.1 %, 76 % de luz azul y con el testigo fluorescente (Tabla 3).

Kim y Hwang (2019) encontraron en plántula de tomate un comportamiento diferente, ya que el mayor peso fresco de tallo se encontró en plántulas que recibieron 0 % de luz azul respecto a luz roja de las que tuvieron 50 %, 70 %, 100 % de luz azul y un testigo fluorescente.

El menor peso fresco de tallo se registró en los tratamientos A34.5, A57.1 y A76.0, lo cual pudo deberse a la existencia de un efecto negativo que tuvieron las plántulas que recibieron luz azul y roja al mismo tiempo, en comparación con los tratamientos monocromáticos A0 y A100 (Tabla 2). Este efecto negativo podría explicarse con base a un proceso fisiológico a nivel de fotorreceptores asociados con luz azul y roja, los cuales al generar mecanismos de señalización intercelular (segundos mensajeros) al ser activados por la luz roja y/o azul, podrían estar generando una comunicación redundante entre estos, lo cual podría ocasionar que procesos de transporte, activación y síntesis hormonal, activación y expresión de genes, entre otros (Berkovich *et al.*, 2017; Demotes-Mainard *et al.*, 2016) se alteren y en consecuencia generen un menor crecimiento en los tejidos de las plántulas que recibieron luz azul y roja al mismo tiempo por lo cual hubo menos peso fresco de hoja que los que recibieron luz monocromática azul y roja (Tabla 3).

En plantas de *Digitalis purpurea* se encontró resultados diferentes respecto al peso fresco de hoja, en donde fue mayor en plantas que recibieron 20 % de luz azul respecto

a luz roja que las que recibieron 0 %, 50 %, 75 % y 100% de luz azul, al igual que las del tratamiento testigo fluorescente (Verma *et al.*, 2018). Por otra parte, en plántulas de tomate se encontró que plántulas que tuvieron tratamientos con 0 %, 30 % y 70 % de luz azul respecto a luz roja, tuvieron el mayor peso fresco de hoja respecto a las que recibieron 100 % de luz azul (Kim y Hwang, 2019).

Las características de las plantas adaptadas a bajas intensidades de luz (Qiansheng *et al.*, 2014), están asociadas a tener hojas más grandes (mayor área foliar) (Stanton *et al.*, 2010) para poder llevar a cabo de la mejor manera el proceso fotosíntesis (Tsukaya, 2005), esta adaptación se presentó en las plántulas del testigo fluorescente, debido a que estas recibieron la mitad de la LID en comparación con las que recibieron luz LED (Tabla 1), lo cual generó un mayor peso fresco de hoja que los tratamientos que recibieron 34.5%, 57.1 % y 100 % de luz azul (Tabla 2). Lo anterior se pudo corroborar, ya que el efecto de la adaptación a baja intensidad de luz, se observó también en las variables de crecimiento asociadas con las hojas de plántula (Tabla 2).

Existieron tres comportamientos generales en los resultados relacionados con el peso fresco de tallo y hoja en plántulas de chile habanero (Tabla 3).

En el primer comportamiento se promovió el desarrollo del tallo en plántulas que solo recibieron luz azul (A100) y se corroboró con los resultados de altura de planta, distancia de entrenudos y peso fresco de tallo (Tabla 2 y 3). En el segundo comportamiento se promovió el desarrollo de las hojas en plántulas que recibieron luz fluorescente y se corroboró con el diámetro de tallo, número de hojas, área foliar, índice de área foliar, área foliar específica, frecuencia estomática y peso fresco de hoja (Tabla 2 y 3).

En el primer comportamiento el tallo fue un órgano de demanda con mayor prioridad de fotosíntesis para su crecimiento respecto a las hojas, y en el segundo comportamiento fue la hoja el órgano de mayor prioridad respecto al tallo (Engels *et al.*, 2012).

En el tercer comportamiento existió un efecto negativo en los resultados de las variables de altura de plántula, distancia de entrenudos y peso fresco de tallo en plántulas que recibieron al mismo tiempo luz azul y roja, en comparación con los tratamientos monocromáticos azul y rojo (Tabla 2 y 3). Esto pudo deberse a un efecto negativo a nivel de fotorreceptores, ya que estos forman parte del sistema de fotorregulación de señalización intercelular con segundos mensajeros, el cual regula la mayoría de los procesos fisiológicos de plantas (Berkovich *et al.*, 2017).

En relación al peso fresco de la parte aérea Hernández y Kubota (2016) registraron en plántula de pepino un comportamiento diferente a los resultados del presente estudio, ya que las plantas que recibieron tratamientos con diferentes porcentajes de luz azul y roja sus resultados se ajustaron a una regresión lineal en donde a mayor porcentaje de luz azul respecto a la luz roja el peso fresco de la parte aérea disminuyó. Hernández *et al.* (2016) encontraron un comportamiento diferente en plántulas de tomate donde el mayor peso fresco

de la parte aérea fue en las plantas que recibieron 10 % y 50 % de luz azul respecto a la roja y de manera contraria los menores pesos estuvieron en las plantas que recibieron el testigo fluorescente y las que tuvieron 0 % y 100 % de luz azul. Por otro lado, Kim y Hwang (2019) en plántulas de tomate el mayor peso fresco de la parte aérea se registró con un tratamiento 0 % y 30 % de luz azul respecto a luz roja y el menor peso fresco en las que recibieron 50 % de luz azul. Los diferentes comportamientos de resultados de peso fresco de la parte aérea que obtuvieron los anteriores autores mencionados en cada investigación individual junto con los resultados del presente estudio a pesar de que nosotros utilizamos tratamientos de luz LED azul y roja en proporciones similares a los autores mencionados, una posible causa de este comportamiento se debió a que la composición espectral de la luz posee un efecto regulatorio fuerte en la morfogénesis de las plantas, el estado hormonal, la ontogénesis, el metabolismo secundario y el crecimiento de la planta, sin embargo, los resultados de estos efectos varían entre especies e inclusive entre cultivares (Berkovich *et al.*, 2017).

El peso fresco de la parte aérea, al ser la suma del peso fresco de tallo más la hoja, se observó un comportamiento diferente al de la suma de sus partes individuales (Tabla 3), mientras que el tratamiento A100 generó que las plántulas tuvieran el mayor peso fresco de tallo y el menor peso fresco de hoja respecto a las de la luz fluorescente y por el contrario, las plántulas del tratamiento fluorescente tuvieron menor peso fresco de tallo y mayor peso de hoja que las del tratamiento A100, el peso fresco de la parte aérea fue estadísticamente el mismo en ambos tratamientos (Tabla 3). Esto corroboró que el testigo fluorescente promovió el desarrollo de la hoja en decremento del tallo y el tratamiento A100 promovió el desarrollo del tallo en decremento de la hoja, pero sin afectar al final la materia fresca total de la plántula (Tabla 3).

De manera contraria, Kim y Hwang (2019) encontraron en plántulas de tomate, que diferentes porcentajes de luz azul y roja, además de un tratamiento fluorescente, no generaron diferencias estadísticas sobre peso seco de tallo y, por el contrario, en peso seco de hoja y peso seco de la parte aérea si existieron resultados con diferencias estadísticas.

Se registraron efectos en el peso seco de hoja en plantas de *Digitalis purpurea* que estuvieron bajo diferentes tratamientos de luz azul y roja (Verma *et al.*, 2018), de manera similar, en plántulas de tomate (Hernández *et al.*, 2016) y en plántulas de pepino (Hernández y Kubota, 2016) tratamientos con diferentes proporciones de luz azul y roja tuvieron efecto en el peso seco de la parte aérea.

Se pudo observar que a pesar de que existió tres comportamientos en las variables de crecimiento que se midieron en plántulas frescas anteriormente descritas (Tabla 2 y 3), al momento de secarlas se encontró que aunque los tratamientos tuvieron efecto en todas las variables de crecimiento que se midieron, al final el peso seco de la parte aérea (biomasa total de la parte aérea de la plántula) fue estadísticamente igual para todos los tratamientos con luz LED como también para el testigo fluorescente (Tabla 4).

Tabla 4. Pigmentos fotosintéticos en hojas en plántula de chile habanero cultivado bajo condiciones controladas con diferentes proporciones de luz LED azul y roja.

Table 4. Photosynthetic pigments and phenolic compounds in habanero pepper seedling leaves, grown under controlled conditions with different proportions of blue and red LED light.

| Variables | Tratamientos | | | | | |
|-----------|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | FL | A0 | A34.5 | A57.1 | A76.0 | A100 |
| Cla | 1.12 ±0.05 a ^x | 0.97 ±0.04 ab | 1.04 ±0.06 ab | 0.92 ±0.04 b | 1.07 ±0.06 ab | 0.95 ±0.03 ab |
| Clb | 0.45 ±0.10 ns | 0.41 ±0.01 ns | 0.45 ±0.09 ns | 0.39 ±0.02 ns | 0.43 ±0.10 ns | 0.40 ±0.02 ns |
| Cltot | 1.57 ±0.07 ns | 1.38 ±0.05 ns | 1.49 ±0.08 ns | 1.31 ±0.06 ns | 1.50 ±0.09 ns | 1.35 ±0.05 ns |
| Cla/b | 1.95 ±0.21 ns | 2.36 ±0.05 ns | 2.09 ±0.16 ns | 2.34 ±0.03 ns | 2.24 ±0.18 ns | 2.42 ±0.05 ns |
| Car | 4.20 ±0.17 ns | 3.80 ±0.12 ns | 4.10 ±0.18 ns | 3.70 ±0.18 ns | 4.20 ±0.23 ns | 3.70 ±0.13 ns |

*Medias con igual letra en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). ns= No significativo; FL= fluorescente (testigo); Cla= Clorofila a (mg g^{-1} de peso fresco); Clb= Clorofila b (mg g^{-1} de peso fresco); Cltot= Clorofila total (mg g^{-1} de peso fresco); Cla/b= Clorofila a/b; Car= Carotenoides (mg g^{-1} de peso fresco).

Este resultado se puede atribuir con base en el proceso de acumulación de biomasa que se llevó a cabo a través del crecimiento, el cual está constituido por las etapas de división y expansión celular (Cosgrove, 2005). El crecimiento está regulado por ciclos circadianos, condiciones ambientales, nutrimentales, hídricas y mediante la señalización con segundos mensajeros y fitohormonas (Poiré *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2009), siendo esta última usadas por los fotorreceptores como uno de sus mecanismos de comunicación en la planta (Berkovich *et al.*, 2017) y además poseen un papel como moléculas reguladoras de crecimiento y desarrollo (Engels *et al.*, 2012).

Dadas las bases fisiológicas del crecimiento, la razón por la cual no existió efectos en la biomasa total de la parte aérea de la plántula en comparación con las variables de crecimiento que se midieron con la plántula en estado fresco, se debió a la diferencia del grado de expansión celular que se presentó en el tejido del tallo y hoja dependiendo del grado de la relación fuente-demanda que ejercieron los diferentes tipos de luz evaluados en ambos tejidos, ya que la expansión celular puede llevarse a cabo en dos o tres dimensiones o por elongación a una dimensión (Carpita *et al.*, 2015).

Al eliminar el agua intercelular de los tejidos frescos, la materia seca que permanece en la planta consiste en más del 90% como celulosa, almidón, lípidos, proteínas y está directamente relacionada con la síntesis de compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis (Engels *et al.*, 2012), lo que demostró que debió de existir una modificación en el volumen intercelular (expansión celular) en el tejido fresco de tallo y hoja respecto a cada tratamiento de luz que se usó, con lo cual provocó una redistribución de biomasa entre ambos tejidos, resultando en una ganancia idéntica de biomasa en la parte aérea de las plántulas sin importar el tratamiento de luz (Tabla 4).

Concentración de pigmentos fotosintéticos en hoja

Los resultados de la concentración de los pigmentos fotosintéticos evaluados en hoja de plántulas de habanero se muestran en el Tabla 4. A pesar de que no existió diferencias estadísticas en la concentración de clorofila a en hojas de plantas que recibieron los diferentes tratamientos de luz LED, las plantas del testigo tuvieron la mayor concentración respecto a las que recibieron 57.1% de luz azul (Tabla 4).

Verma *et al.* (2018) encontraron en plantas de *Digitalis purpurea* un comportamiento diferente en la concentración de clorofila a, ya que en plantas que recibieron 100 % de luz azul tuvieron mayor concentración que las que recibieron 20 %, 50 % y 80 % de luz azul respecto a luz roja, sin embargo, al compararse con la que recibieron solo luz roja no tuvieron diferencias estadísticas.

El comportamiento de la concentración de clorofila a en el testigo, pudo deberse a que al tener la mitad de la luz integral diaria (LDI) $6.4 (\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1})$ respecto a los tratamientos con luz LED evaluados, quienes estuvieron en un intervalo de 13.0 y $13.2 (\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1})$ (Tabla 1), ocasionó una mayor síntesis de clorofila a para hacer más eficiente la captura y el uso de la luz, lo cual es un mecanismo de plantas adaptadas a baja intensidad de luz (Qiansheng *et al.*, 2014).

Por otra parte, en relación al resto de pigmentos fotosintéticos evaluados, diversos autores sí encontraron diferencias estadísticas en diversos cultivos cuando se usaron tratamientos con diferentes porcentajes de luz azul y roja, como es el caso de la concentración de clorofila b en plantas de *D. purpurea* (Verma *et al.*, 2018); en la concentración de clorofila total en plántulas de tomate (Hernández *et al.*, 2016), plántulas de pepino (Hernández y Kubota, 2016), plántulas de colza (Shengxin *et al.*, 2016) y plantas de espinaca (Agarwal *et al.*, 2018); en la relación de clorofila a/b en plántulas de colza (Shengxin *et al.*, 2016) y plantas de espinaca (Agarwal *et al.*, 2018) y finalmente, en la concentración de carotenoides en plantas de *Digitalis purpurea* (Verma *et al.*, 2018) y plantas de espinaca (Agarwal *et al.*, 2018).

El comportamiento de los pigmentos fotosintéticos que no presentaron diferencias estadísticas, se pudo atribuir al alto grado de plasticidad de la aclimatación que las plantas tuvieron bajo los diferentes tipos de luz (Berkovich *et al.*, 2017; Pocock, 2015), lo cual es consistente con los resultados de las diversas investigaciones que se mencionaron previamente, en donde se obtuvieron diferentes resultados con tratamientos con proporciones de luz LED azul y roja.

CONCLUSIONES

El tratamiento con luz azul al 100% promovió el crecimiento del tallo, mientras el testigo con luz fluorescente promovió el crecimiento de la hoja. Los diferentes tratamientos con luz LED no tuvieron efecto en peso seco de parte aérea ni en pigmentos fotosintéticos, por otro lado, los tratamientos que combinaron luz LED azul y roja indujeron un efecto negativo en la altura de plántula, distancia de entrenudos y peso fresco de tallo.

REFERENCIAS

- Adame-García, J., Murillo-Cuevas, F.D., Flores-de la Rosa, F.R., Velázquez-Mendoza, V., López-Vázquez, M., Cabrera-Mireles, H. y Antonio-Vázquez, E. 2021. Identificación molecular y evaluación de bacterias en el desarrollo vegetativo y producción de chile habanero. *Biotecnia*. 23(3): 151-157. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i3.1480>
- Agarwal, A., Gupta, S.D., Barman, M. y Mitra, A. 2018. Photosynthetic apparatus plays a central role in photosensitive physiological acclimations affecting spinach (*Spinacia oleracea* L.) growth in response to blue and red photon flux ratios. *Environmental and Experimental Botany*. 156: 170-182. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.09.009>
- Amanullah. 2015. Specific leaf area and specific leaf weight in small grain crops wheat, rye, barley, and oats differ at various growth stages and NPK source. *Journal of Plant Nutrition*. 38: 1694-1708. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1017051>
- AOAC. 1980. Official methods of analysis. 12th ed. Association of Official Analytical Chemistry. Washington, D.C.
- Berkovich, Y.A., Konovalova, I.O., Smolyanina, S.O., Erokhin, A.N., Avercheva, O.V., Bassarskaya, E.M., Kochetova, G.V., Zhigalova, T.V., Yakovleva, O.S. y Tarakanov, I.G. 2017. LED crop illumination inside space greenhouses. *REACH - Reviews in Human Space Exploration*. 6: 11-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reach.2017.06.001>
- Bojórquez-Quintal, E., Velarde-Buendía, A., Ku-González, A., Carrillo-Pech, M., Ortega-Camacho, D., Echevarría-Machado, I., Pottosin I. y Martínez-Estévez, M. 2014. Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. *Frontiers in Plant Science*. 5: 605. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00605>
- Carpita, N.C., Maureen, J.R. y McCann, C. 2015. The Cell Wall. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B. B. Buchanan, W. Gruissem y R.L. Jones (eds.), pp 45-110. Wiley Blackwell, UK.
- Castillo-Aguilar, C. de la C., Quej-Ch, I. V., Coh-Méndez, D., Carrillo-Ávila, E. y Monsalvo-Espinosa, A. 2015. Producción de planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agro-Productividad*. 8(4): 73-78.
- CICY. 2016. Ficha informativa unidad productora de semillas de chile habanero. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Abril (2016): 1-15. [Consultado 10 enero 2020]. Disponible en: <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/quienes-somos/2016/Ficha-UPS-Habanero.pdf>
- Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6(11): 850-861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Demotes-Mainard, S., Pérona, T., Corotb, A., Bertheloot, J., Gourriereb, J.L., Pelleschi-Travierb, S., Crespel, L., Morel, P., Huché-Thélier, L., Boumaza, R., Vian, A., Guérin, V., Leduc, N. y Sakr, S. 2016. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*. 121: 4-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.010>
- Engels, C., Kirkby, E. y White, P. 2012. Mineral Nutrition, Yield and Source-Sink Relationships. En: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. P. Marschner (ed.), pp 85-133. Academic Press, USA. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00005-4>
- Hernández, R. y Kubota, C. 2016. Physiological responses of cucumber seedlings under different blue and red photon flux ratios using LEDs. *Environmental and Experimental Botany*. 121: 66-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.001>
- Hernández, R., Eguchib, T., Devecic, M. y Kubota, C. 2016. Tomato seedling physiological responses under different percentages of blue and red photon flux ratios using LEDs and cool white fluorescent lamps. *Scientia Horticulturae*. 213: 270-280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.005>
- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular* 347. California Agricultural Experiment Station. California, USA. 32 p.
- Huché-Thélier, L., Crespel, L., Gourrierec, J.L., Morel, P., Sakr, S. y Leduc, N. 2016. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations—Perspectives for applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*. 121: 22-38. <https://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.009>
- Katagiri, F., Canelon-Suarez, D., Griffin, K., Petersen, J., Meyer, R.K. y Siegle, M. 2015. Design and construction of an inexpensive homemade plant growth chamber. *PLoS ONE*. 10(5): e0126826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126826>
- Kim, H.M., y Hwang, S.J. 2019. The growth and development of 'Mini Chal' tomato plug seedlings grown under monochromatic or combined red and blue light-emitting diode. *Horticultural Science and Technology*. 37(2): 190-205. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20190019>
- Kozai, T., Shibuya T., He, D., Zobayed, S. y Chun, C. 2016. Transplant production in closed system. En: *Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production*. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (eds.), pp 237-269. Academic Press, USA. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.00019-6>
- Kozai, T. y Niu, G. 2016. Role of the plant factory with artificial lighting (PFAL) in urban areas. En: *Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production*. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (eds.), pp 115-128. Academic Press, USA. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.00002-0>
- Kubota, C. 2016. Growth, development, transpiration and translocation as affected by abiotic environmental factors. En: *Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production*. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (ed.), pp 151-164. Academic Press, USA. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.00010-X>
- Lim, T. K. 2013. *Capsicum chinense*. En: *Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 6, Fruits*. T. K. Lim (ed.), pp 205-212. Springer Science+Business Media, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5628-1_30
- Liu, X. Y., Jiao, X. L., Chang, T. T., Guo, S. R. y Xu, Z. G. 2018. Photosynthesis and leaf development of cherry tomato seedlings under different LED-based blue and red photon flux ratios. *Photosynthetica*. 56: 1212-1217. <https://dx.doi.org/10.1007/s11099-018-0814-8>
- Mendoza-Paredes, J.E., Castillo-González, A.M., Avitia-García, E., Valdéz-Aguilar, L.A. y García-Mateos, M.R. 2021a. Efecto de diferentes proporciones de luz LED azul:roja en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Biotecnia*. 23(1): 110-119. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.1288>

- Mendoza-Paredes, J.E., Castillo-González, A.M., Valdéz-Aguilar, L.A., Avitia-García, E. y García-Mateos, M.R. 2021b. Respuesta de cilantro (*Coriandrum sativum* L.) a la luz LED azul y roja. *Biotecnia*. 23(2): 149-160. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i2.1340>
- Pocock, T. 2015. Light-emitting diodes and the modulation of specialty crops: light sensing and signaling networks in plants. *HortScience*. 50(9): 1281-1284. <https://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.50.9.1281>
- Poiré, R., Wiese-Klinkenberg, A., Parent, B., Mielewczik, M., Schurr, U., Tardieu, F., y Walter, A. 2010. Diel time-courses of leaf growth in monocot and dicot species: endogenous rhythms and temperature effect. *Journal of Experimental Botany*. 61: 1751-1759. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq049>
- Qiansheng, L., Deng, M., Xiong, Y., Coombes, A. y Zhao, W. 2014. Morphological and photosynthetic response to high and low Irradiance of *Aeschynanthus longicaulis*. *The Scientific World Journal*. 2014: 347461. 1-8, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/347461>
- Ruiz-Lau, N., Medina, F. y Martínez, M. 2011. El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia*. Julio-Septiembre: 70-77.
- SAS Institute. 2002. SAS System for Windows Computer Program. Software Version 9.0. Cary, North Carolina, USA. 1861 p.
- Shengxin, C., Chunxia, L., Xuyang, Y., Song, C., Xuelej, J., Xiaoying, L., Zhigang, X. y Rongzhan, G. 2016. Morphological, photosynthetic, and physiological responses of rapeseed leaf to different combinations of red and blue lights at the rosette stage. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1144. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01144>
- Stanton, K.M., Weeks, S.S., Dana, M.N. y Mickelbart, M.V. 2010. Light exposure and shade effects on growth, flowering, and leaf morphology of *Spiraea alba* Du Roi and *Spiraea tomentosa* L. *HortScience*. 45(12): 1912-1916. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.12.1912>
- Tsukaya, H. 2005. Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *The International Journal of Developmental Biology*. 49: 547-555. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041921ht>
- Trujillo, J.J.G. 2018. Caracterización de los recursos genéticos de *Capsicum chinense* Jacq. en la península de Yucatán. En: Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán. T.A. González (ed.), pp 37-43. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México.
- Verma, S.K., Gantait, S., Jeong, B.R. y Hwang, S.J. 2018. Enhanced growth and cardenolides production in *Digitalis purpurea* under the influence of different LED exposures in the plant factory. *Nature Scientific Reports*. 8: 18009. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36113-9>
- Walter, A., Silk, W.K. y Schurr, U. 2009. Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. *Annual Review of Plant Biology*. 60: 279-304. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092819>
- Wollaeger, H.M. y Runkle, E.S. 2015. Growth and acclimation of impatiens, salvia, petunia, and tomato seedlings to blue and red light. *HortScience*. 50(4): 522-529. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.4.522>
- Yamori, W. 2016. Photosynthesis and respiration. En: Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (ed.), pp 141-149. Academic Press, USA. [https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.0009-3\(LAI\)](https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.0009-3(LAI))



Uso de un diseño de mezclas para el desarrollo de hamburguesas de carne de bovino, con un perfil nutricional mejorado con harina de linaza, pulpa de mango y ciruela deshidratada

Usage of a mixture design for the development of beef patties, with an improved nutritional profile with flaxseed flour, mango pulp, and dried plum

Carlos Montalvo-Navarro¹, Germán Cumplido-Barbeitia¹, Humberto González-Ríos¹, Luz del Carmen Montoya-Ballesteros², Anna Judith Pérez-Báez¹, Libertad Zamorano-García¹, Martín Valenzuela-Melendres^{1*}

¹ Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, CP 83304, Hermosillo, Sonora, México.

² Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, CP 83304, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para estudiar los efectos de harina de linaza (HL), pulpa de mango (PM) y ciruela deshidratada (CD) sobre la calidad fisicoquímica y sensorial de hamburguesas de carne de bovino. Además, se optimizó su incorporación en la formulación cárnica para incrementar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, sin demérito en su calidad, usando para ello un diseño de mezclas. De acuerdo a los modelos de regresión obtenidos, la adición de HL y PM aumentó el color instrumental ($p < 0.05$), mientras que la CD lo disminuyó. La acidez aumentó por la adición de PM o CD, y el rendimiento aumentó por la adición de HL y CD. La incorporación de PM o CD incrementó las propiedades sensoriales y los valores de textura, mientras que la HL tuvo un efecto contrario. La fórmula óptima incluyó 6 % HL, 10.5 % PM y 3.5 % CD, y tuvo mayor contenido de ácidos grasos polinsaturados, principalmente omega-3. Las hamburguesas de carne de bovino adicionadas con HL, PM y CD son una alternativa de alimentación más saludable para la población. Son necesarios estudios posteriores que demuestren el impacto de su consumo en la salud de las personas.

Palabras clave: Hamburguesa de carne de bovino, productos cárnicos funcionales, desarrollo de nuevos productos

ABSTRACT

The response surface methodology was used to study the effects of flaxseed flour (FS), mango pulp (MP), and dried prune (DP), on the physicochemical and sensory properties of beef patties. In addition, its incorporation into the meat formulation was optimized to increase the content of polyunsaturated fatty acids without demerit in their quality properties, by using a mixture design. According to the obtained models, FS and MP addition increased the instrumental color values ($p < 0.05$), while DP decreased them. The pH values decreased by the addition of MP or DP, and cooking yield increased by the addition of FS and DP. The incorporation of MP or DP increased sensory properties and

texture values, while FS had a contrary effect. The optimized formulation included 6 % FS, 10.5 % MP and 3.5 % DP, which resulted in a higher amount of polyunsaturated fatty acids, mainly omega-3. Beef patties formulated with FS, MP, and DP could be a healthier food alternative for the population. Further studies are necessary to demonstrate the impact of its consumption on the health of consumers.

Keywords: beef patties, functional meat products, new products development

INTRODUCCIÓN

La producción de carne tiene un peso importante en la economía de México, ya que en 2017 esta actividad se posicionó en el primer lugar dentro del valor de la producción agropecuaria. Los mexicanos consumen en promedio 69 kg de carne, destacando el pollo, cerdo y res (Comecarne, 2021). Respecto a la carne de bovino, su producción durante el 2020 fue de 2.1 millones de toneladas, con una proyección de 1.98 millones para el 2021 (SIAP, 2021). Los cortes que más demandan tienen entre los consumidores son el bistec, la milanesa y la carne molida (Domínguez-Vara y Mondragón-Anselmo, 2018). Esta última se utiliza generalmente para la preparación de alimentos como picadillo, albóndigas y hamburguesas. Las hamburguesas elaboradas con carne de bovino son excelente fuente de proteínas de alto valor biológico, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. Su incremento de producción en establecimientos de comida rápida, su conveniencia y bajo precio la han posicionado como uno de los productos cárnicos procesados más populares (Selani *et al.*, 2016). Además, la hamburguesa se ha convertido en un atractivo principal en supermercados, distribuidores de comida rápida y restaurantes alrededor del mundo. Sin embargo, la hamburguesa es un producto cárnico procesado y como tal su consumo se ha asociado a enfermedades cardiovasculares y cáncer colorectal, debido principalmente a su contenido de grasas saturadas, colesterol y sal (do Prado *et al.*, 2019). Ante estas situaciones, los consumidores se han vuelto más conscientes respecto a una dieta saludable, demandando productos con un perfil de lípidos

*Autor para correspondencia: Martín Valenzuela Melendres

Correo electrónico: martin@ciad.mx

Recibido: 5 de julio de 2021

Aceptado: 1 de diciembre de 2021

mejorado, reducidos en colesterol y sodio; o formulados con ingredientes nóveles que tienen un probado efecto benéfico en la salud (do Prado *et al.*, 2019). Además, buscan productos con etiqueta limpia; es decir, aquellos que tienen una lista de ingredientes corta, simple, sin connotaciones químicas, con ingredientes reconocibles y usualmente encontrados en una cocina (Asioli *et al.*, 2017).

La adición de ingredientes no tradicionales como aceites vegetales, fibra o compuestos bioactivos ha resultado una estrategia exitosa para disminuir el contenido de grasas saturadas y mejorar el perfil nutricional en productos como las hamburguesas (Botez *et al.*, 2017)2017. Entre los ingredientes con potencial para desarrollar productos cárnicos con una connotación más saludable se encuentran la harina de linaza, la pulpa de mango y la ciruela deshidratada. La harina de linaza es una excelente fuente de ácidos grasos omega-3, destacando el ácido linoléico con un 57 % del total de los ácidos grasos, compuesto conocido por reducir niveles de colesterol y brindar beneficios a la salud (Bilek y Turhan, 2009). Sin embargo, no ha sido posible incorporar más del 3 % en la formulación en productos cárnicos debido a un detrimento en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales (Valenzuela-Melendres *et al.*, 2018). Por otra parte, el mango y la ciruela deshidratada son fuente de antioxidantes como compuestos fenólicos, carotenoides y vitamina C, además de fibra dietética (Jarvis *et al.*, 2015; Torres-León *et al.*, 2016), y su incorporación en productos cárnicos reducen la oxidación lipídica y la cuenta total de microorganismos durante su vida de anaquel (Nuñez de González *et al.*, 2008; Kadakadiyavar *et al.*, 2017), además de mejorar las propiedades sensoriales, sin un efecto marcado en las características fisicoquímicas (Yıldız-Turp y Serdaroglu, 2010).

Se ha reportado la adición de estos ingredientes en carnes procesadas para mejorar sus propiedades nutricionales y tecnológicas. Por ejemplo, se ha incorporado harina de linaza como ingrediente en hamburguesas, obteniendo un producto con un mejor perfil de lípidos, pero un problema persistente es el detrimento en sus propiedades sensoriales y una mayor susceptibilidad al deterioro de los ácidos grasos (Valenzuela-Melendres *et al.*, 2018). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la pulpa de mango es rica en compuestos antioxidantes que pueden ser incorporados para superar el problema de la oxidación de ácidos grasos polinsaturados, además de que pueden contribuir con mejores propiedades sensoriales en los productos cárnicos (Bhat *et al.*, 2017). Por otro lado, la adición de la ciruela deshidratada en formulaciones cárnicas ha sido reportada por diversos investigadores, destacando su efecto positivo en parámetros sensoriales como la textura, jugosidad y sabor (Jarvis *et al.*, 2015). Por todo lo anterior, es posible hipotetizar que tanto la pulpa de mango como la ciruela deshidratada pueden ser utilizadas para reducir el impacto negativo que la harina de linaza ejerce en las formulaciones cárnicas, buscando la combinación óptima entre los tres ingredientes que resulte en un producto con un contenido de ácidos grasos poliinsaturados

mayor al de una hamburguesa tradicional, pero con el menor impacto en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

Determinar los efectos e interacciones entre múltiples ingredientes sobre la calidad de un producto cárnico es complicado si no se utiliza la estrategia metodológica adecuada (Botez *et al.*, 2017)2017. La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una técnica matemática que permite optimizar la incorporación de nuevos ingredientes y ha sido utilizada con éxito en el desarrollo de nuevos productos cárnicos (Keenan *et al.*, 2014; Valenzuela-Melendres *et al.*, 2014). El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de harina de linaza, pulpa de mango y ciruela deshidratada sobre la calidad de hamburguesas de carne de bovino, y optimizar por MSR la incorporación de estos ingredientes en su formulación para generar un producto con mejor perfil nutricional, pero sin demérito en sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se estudiaron los efectos de harina de linaza (HL), pulpa de mango (PM) y ciruela deshidratada (CD) sobre la calidad de hamburguesas de carne de bovino mediante el uso de la MSR, utilizando para ello un diseño de mezclas simplex centroide. Los niveles de los factores fueron: HL (0 a 20 %), PM (0 a 20 %) y CD (0 a 20 %) y con ellos se generaron 14 tratamientos o corridas experimentales (Tabla 1). Los tratamientos con los límites máximos de incorporación de cada ingrediente y el correspondiente a la mezcla de partes iguales (punto central del diseño), fueron repetidos durante el experimento para estimar el error experimental y la falta de ajuste de los modelos de regresión resultante. Las mediciones realizadas fueron: color instrumental, pH, rendimiento de cocción (RC), reducción del diámetro (RD), análisis de perfil de textura (APT) y análisis sensorial (AS). Se realizaron dos repeticiones del experimento completo y en cada repetición se analizaron tres muestras por tratamiento para la evaluación de la calidad para un total de 6 muestras por tratamiento.

Ingredientes utilizados, materiales y elaboración del producto

La harina de linaza (Bob's Red Mill, Oregon, USA), pulpa de mango y ciruela deshidratada (Sunsweet Growers Inc., Yuba, CA, USA), fueron adquiridos de supermercados locales y usados como ingredientes para formular las hamburguesas. La carne de bovino magra (*Semimembranos*, 72 % humedad, 6 % lípidos, 20 % proteína y 2 % ceniza), pH 5.82 fue adquirida con un distribuidor directo de carne local y utilizada el mismo día de su compra. La carne fue molida en un equipo Hobart (modelo 4152, Troy, Ohio, USA) a través de un plato con orificios de 4.7 mm. La pulpa de mango se obtuvo de frutos de la variedad Haden en estado de madurez de consumo, sin deformaciones ni daños en la cutícula. La harina de linaza fue directamente añadida en

Tabla 1. Composición de las mezclas en hamburguesas de carne de bovino formuladas con harina de linaza, pulpa de mango y ciruela deshidratada en un diseño de mezclas simplex centroide de tres componentes.

Table 1. Composition of mixtures in beef patties formulated with flaxseed flour, mango pulp and dried plum in a simplex centroid three-component mixture design.

| Tratamiento | Valores codificados | | | Valores reales (%) | | |
|-------------|---------------------|------|------|--------------------|-------|-------|
| | HL | PM | CD | HL | PM | CD |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 20 |
| 4 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0 | 10 | 10 |
| 5 | 0.5 | 0 | 0.5 | 10 | 0 | 10 |
| 6 | 0.5 | 0.5 | 0 | 10 | 10 | 0 |
| 7 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 6.67 | 6.67 | 6.67 |
| 8 | 0.67 | 0.17 | 0.17 | 13.32 | 3.34 | 3.34 |
| 9 | 0.17 | 0.67 | 0.17 | 3.34 | 13.32 | 3.34 |
| 10 | 0.17 | 0.17 | 0.67 | 3.34 | 3.34 | 13.32 |
| 11 | 1 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 20 |
| 14 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 6.67 | 6.67 | 6.67 |

HL = harina de linaza, PM = pulpa de mango, CD = ciruela deshidratada.
Proporción de HL + PM + CD = 1.

las hamburguesas. Se utilizó un procesador de alimentos (NutriBullet NUBPT0101, Los Angeles, CA, USA) para moler en forma separada la pulpa de mango y ciruela deshidratada hasta obtener un puré. Lotes de 1 kg por tratamiento fueron usados para la preparación de las hamburguesas. La carne, la harina de linaza, la pulpa de mango y la ciruela deshidratada fueron mezclados de acuerdo a los porcentajes especificados en las corridas experimentales de la Tabla 1. Los ingredientes en cada lote fueron homogenizados manualmente por 10 min y las hamburguesas fueron formadas manualmente en muestras de 9 cm x 1 cm de grosor para obtener 60 g por unidad. Las hamburguesas fueron cocinadas en un sartén eléctrico (Cook Master Oster, Model 3222-3, Mississauga, Ontario, Canadá) durante 1 min por cada lado y después 15 s por lado hasta alcanzar 72 °C medidos por un termopar en el centro geométrico de la hamburguesa.

Color instrumental, pH, rendimiento de cocción y encogimiento al cocinar

El color fue evaluado manteniendo todos los tratamientos a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 5 min antes de su medición utilizando un colorímetro (Chroma meter CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan) con iluminante D65, observador de 10° y apertura de 11 mm del instrumento para iluminación y 8 mm para medición. Las coordenadas determinadas fueron: luminosidad (L^* , donde 0 = negro y 100 = blanco), matiz verde-rojo (a^* , donde -60 = verde y +60 = rojo) y matiz azul-amarillo (b^* , donde -60 = azul y +60 = amarillo). Se tomaron nueve repeticiones de cada

muestra, siguiendo las guías para la evaluación colorimétrica de carnes.

El pH fue medido directamente en hamburguesas cocinadas con un potenciómetro portátil (Hanna, Model HI 98140, Woonsocket, RI, USA) equipado con una combinación electrodos de pH tipo punción.

Las hamburguesas fueron pesadas antes y después de ser cocinadas utilizando una balanza de precisión (L-EQ Torrey, Monterrey, México), después se enfriaron a 25 °C y secaron con una toalla de papel para retirar el agua y la grasa liberadas durante el cocinado. El rendimiento de cocción (RC) fue calculado por medio de una fórmula (Ec. 1):

$$RC = \frac{m2}{m1} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde $m1$ es el peso (g) de la hamburguesa antes de cocción y $m2$ es el peso (g) después de cocción (Szerman *et al.*, 2019). Por otro lado, la reducción del diámetro (RD) en las hamburguesas por el proceso de cocción fue calculado por medio de la fórmula (Ec. 2):

$$RD = \frac{D1 - D2}{D1} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde $D1$ es el diámetro (cm) de la hamburguesa cruda y $D2$ es el diámetro (cm) de la hamburguesa cocinada.

Análisis de perfil de textura

El análisis de perfil de textura se realizó en muestras de hamburguesas cocinadas, a 4 ± 1 °C con un analizador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Surrey, UK) siguiendo los métodos para la medición de textura de productos cárnicos (Claus, 1995). Muestras cúbicas ($1 \times 1 \times 1$ cm) fueron cortadas de las hamburguesas cocinadas y sometidas a pruebas de compresión de dos ciclos. Las muestras fueron comprimidas hasta 50 % de su altura original con una sonda cilíndrica de 75 mm de diámetro unida a una celda de compresión de 50 kg con una velocidad de cabezal de 1 mm/s. Los parámetros de perfil de textura fueron determinados de acuerdo a Bourne (1978), e interpretados de la siguiente manera: dureza (N) como la fuerza máxima requerida para comprimir la muestra; cohesividad como la extensión en la cual la muestra puede ser deformada antes de su ruptura (A2/A1), donde A1 es la energía total requerida para la primera compresión y A2 es la energía total requerida para la segunda compresión; elasticidad (cm) como la habilidad de las muestras para recuperar su forma original después de que la fuerza de deformación es removida; masticabilidad (N/cm) como el trabajo necesario para masticar la muestra y posteriormente engullirla (dureza \times cohesividad \times elasticidad).

Análisis sensorial

La evaluación sensorial se realizó por quince panelistas, 8 hombres y 7 mujeres, con experiencia previa en análisis sensorial y consumidores regulares de hamburguesas. El análisis sensorial se realizó en dos días diferentes, en los que todos los panelistas evaluaron 7 muestras por día, seleccionadas al azar. El panel estuvo integrado por personal y estudiantes de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal de la institución. La evaluación sensorial se realizó en un cuarto dividido en cabinas individuales y ambiente controlado (23 ± 1 °C, 55 ± 5 % HR). Previo al análisis, los panelistas obtuvieron un entrenamiento donde se explicó el objetivo del proyecto, se explicaron los descriptores a calificar y la escala de evaluación. Durante la evaluación sensorial, cuatro hamburguesas de cada formulación fueron cocinadas como se describió previamente, cubiertas y mantenidas a 60 °C en un horno hasta su evaluación por 4-7 min. Las hamburguesas fueron cortadas en cuatro partes iguales y servidas inmediatamente. Cada muestra fue codificada con números de tres dígitos aleatoriamente seleccionados. Los panelistas fueron instruidos para limpiar sus paladares entre cada muestra utilizando agua y galletas sin sal. Cada panelista evaluó todas las formulaciones en un orden aleatorio y se les pidió evaluar en una escala de 0 a 10 los siguientes atributos: sabor (0 = nada intenso/10 = muy intenso), textura (0 = dura/10 = blanda) y jugosidad (0 = seca/10 = jugosa).

Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico, se utilizó la MSR. Primeramente, cada variable respuesta fue ajustada a un modelo cúbico especial (Ec. 3) para modelar los datos obtenidos en el experimento.

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (\text{Ec. 3})$$

donde y es la variable de respuesta (color, pH, RC, RD, APT y AS), β es el coeficiente de regresión y x es la proporción de los componentes (HL, PM y CD) en la formulación. Para el análisis de resultados se utilizó el software Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Para cada variable respuesta, se realizó un análisis de varianza para estimar las significancias ($p < 0.05$) de los factores estudiados. Se estimaron los coeficientes de regresión, el coeficiente de determinación (R^2) y falta de ajuste de los modelos resultantes.

Con los modelos predictivos seleccionados, se llevó a cabo la optimización de las respuestas, mediante la técnica de optimización numérica del software *Design Expert* para la optimización simultánea de múltiples respuestas. Para el presente estudio, la formulación óptima de hamburguesa de carne de bovino se predijo maximizando la incorporación de HL, PM y CD. Se eligieron los objetivos deseados para cada variable de respuesta. La formulación óptima se usó para estimar los valores predichos de las variables de respuesta utilizando las ecuaciones de predicción derivadas de la MSR. Para la validación de los modelos, se preparó un lote de hamburguesas con los niveles óptimos de los ingredientes, se evaluaron experimentalmente las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de acuerdo las metodologías descritas anteriormente, y se compararon estadísticamente ($p < 0.05$) con los valores predichos por los modelos. Finalmente, se realizó una comparación entre la formulación optimizada y una formulación típica de hamburguesas con 20 % de grasa de bovino en términos de composición proximal y perfil de ácidos grasos. La composición proximal (humedad, grasa, proteína y ceniza), se realizó siguiendo las técnicas descritas por la AOAC (1990), mientras que el perfil de ácidos grasos se realizó de acuerdo a la técnica especificada por Valenzuela-Melendres *et al.* (2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades fisicoquímicas

La Tabla 2 muestra los valores experimentales resultantes para todas las propiedades fisicoquímicas. En la Tabla 3 se muestran los modelos de regresión obtenidos para predecir el color instrumental (L^* , a^* , b^*), pH, rendimiento de cocción (RC), reducción de diámetro (RD) y análisis de perfil de textura de hamburguesas de carne de bovino, en función de la adición de harina de linaza (HL), pulpa de mango (PM) y ciruela deshidratada (CD). Se muestra también el análisis de varianza, la falta de ajuste y el coeficiente de determinación (R^2) de los modelos de regresión para cada variable de respuesta estudiada. Un signo positivo en el modelo de regresión indica que a medida que se adiciona el ingrediente, la variable de respuesta también lo hace. Un signo negativo en el modelo indica que a medida que se adiciona el ingrediente, la variable de respuesta disminuye. Las Figuras 1-2 muestran los efectos y tendencias de las variables de proceso para cada propiedad fisicoquímica del producto.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas y sensoriales de hamburguesas de carne de bovino formuladas con harina de linaza, pulpa de mango y ciruela deshidratada.

Table 2. Physicochemical and sensory properties of beef patties formulated with flaxseed flour, mango pulp and dried plum.

| Tratamiento | L* | a* | b* | pH | RC | RD | Dureza | Elasticidad | Cohesividad | Masticabilidad | Sabor | Textura | Jugosidad |
|-------------|----|------|------|------|------|------|--------|-------------|-------------|----------------|-------|---------|-----------|
| 1 | 43 | 16.2 | 20.1 | 5.49 | 89.2 | 4.79 | 6.05 | 0.53 | 0.27 | 0.98 | 3.71 | 4.87 | 3.73 |
| 2 | 45 | 19.5 | 17.6 | 5.15 | 65 | 12.3 | 10.13 | 0.77 | 0.39 | 3.5 | 6.79 | 8.33 | 6.69 |
| 3 | 32 | 11 | 12.8 | 5.02 | 74.4 | 13.8 | 10.17 | 0.74 | 0.41 | 3.14 | 8.37 | 7.85 | 7.05 |
| 4 | 37 | 15.4 | 16.4 | 5.06 | 72.8 | 13.1 | 7.37 | 0.84 | 0.42 | 2.75 | 7.23 | 7.58 | 5.9 |
| 5 | 37 | 11.7 | 16.7 | 5.22 | 88.1 | 9.58 | 4.61 | 0.78 | 0.31 | 1.11 | 4.62 | 6.47 | 4.36 |
| 6 | 44 | 17.7 | 19 | 5.3 | 81.4 | 9.79 | 4.37 | 0.695 | 0.34 | 1.03 | 4.36 | 6.57 | 5.13 |
| 7 | 38 | 14.9 | 17.2 | 5.17 | 79.2 | 11 | 5.53 | 0.61 | 0.33 | 1.07 | 6.01 | 6.57 | 6.16 |
| 8 | 42 | 14.9 | 18.4 | 5.32 | 87.8 | 9.79 | 4.89 | 0.6 | 0.31 | 0.84 | 4.14 | 7.07 | 4.32 |
| 9 | 41 | 18.1 | 18.2 | 5.14 | 74.2 | 15.2 | 7.11 | 0.6 | 0.37 | 1.71 | 6.78 | 8.7 | 7.5 |
| 10 | 35 | 12.5 | 15.6 | 5.06 | 75 | 13.5 | 6.87 | 0.55 | 0.32 | 1.2 | 7.36 | 8.1 | 7.08 |
| 11 | 43 | 16 | 20.1 | 5.47 | 89.2 | 7.71 | 6.11 | 0.56 | 0.31 | 1.18 | 3.42 | 5.78 | 3.98 |
| 12 | 45 | 17.5 | 18.2 | 5.11 | 62.2 | 12.5 | 13.13 | 0.77 | 0.39 | 4.17 | 6.71 | 8.06 | 6.95 |
| 13 | 32 | 10.7 | 13.2 | 4.97 | 72.8 | 11.3 | 10.67 | 0.59 | 0.37 | 2.47 | 8.68 | 7.13 | 6.91 |
| 14 | 38 | 16 | 17.3 | 5.19 | 82.5 | 10.6 | 7.01 | 0.56 | 0.34 | 1.38 | 5.7 | 6.98 | 5.34 |

RC = rendimiento por cocción (%), RD = reducción de diámetro (%), dureza (N), elasticidad (cm), cohesividad (adimensional), masticabilidad (N/cm), sabor (0 = nada intenso/10 = muy intenso), textura (0 = dura/10 = blanda) y jugosidad (0 = seca/10 = jugosa).

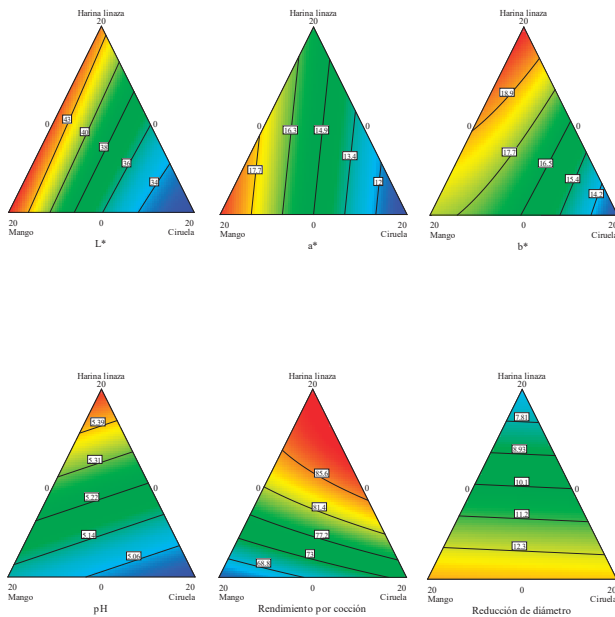


Figura 1. Gráfico de contorno de diseño de mezclas para color instrumental: L* (luminosidad), a* (matiz verde-rojo) y b* (matiz azul-amarillo), pH, rendimiento por cocción y reducción de diámetro en hamburguesas de carne de bovino adicionadas con HL, PM y CD.

Figure 1. Mixture design contour plot for instrumental color: L* (lightness), a* (green-red axis) and b* (blue-yellow axis), pH, cooking yield and diameter reduction, in added beef patties added with FS, MP and DP.

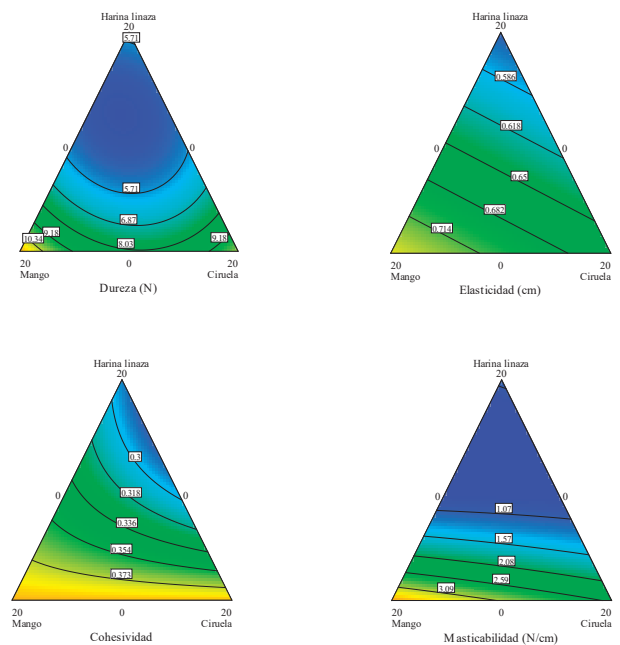


Figura 2. Gráfico de contorno de diseño de mezclas para perfil de textura: dureza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad de hamburguesas de carne de bovino adicionadas con HL, PM y CD.

Figure 2. Mixture design contour plot for texture profile analysis: hardness, elasticity, cohesiveness and chewiness of beef patties added with FS, MP and DP.

Color instrumental

Los modelos de regresión para los valores L^* , a^* y b^* fueron significativos ($p < 0.05$), tuvieron un coeficiente de determinación mayor a 0.92 y no presentaron falta de ajuste ($p > 0.05$), elementos suficientes que indican que son adecuados para predecir la variable de respuesta. La Figura 1 muestra la gráfica de contorno para los valores L^* , a^* y b^* en función de la adición de HL, PM y CD. La Tabla 2 muestra los valores del color instrumental para todos los tratamientos evaluados, donde los promedios resultantes para L^* , a^* y b^* fueron 39.04, 15.37 y 16.82, respectivamente. El color de los productos cárnicos depende de varios factores que incluyen la cantidad y estado químico de la mioglobina, las características fisicoquímicas de la carne, y el tipo y cantidad de ingredientes no cárnicos en la formulación del producto (Cofrades *et al.*, 2004).

De acuerdo a los modelos de regresión, todos los parámetros del color instrumental aumentaron ($p < 0.05$) por la incorporación de PM y HL, y disminuyeron ($p < 0.05$) al incorporar CD en la formulación cárnica. El efecto que tiene la adición de PM en el incremento del color del producto puede deberse a varias razones; por un lado, la alta humedad de la PM provoca un mayor reflejo de la luz sobre la superficie del alimento. Por otro lado, la PM es rica en compuestos antioxidantes, principalmente carotenoides, que retardan la oxidación de la mioglobina de la carne, responsable del color rojo característico de este producto. Wongkaew *et al.* (2020) adicionaron pectina de cáscara de mango a salchichas de

cerdo hasta un nivel del 15 % y reportaron un incremento del color en el producto atribuido a los compuestos carotenoides presentes en la cáscara de mango. Resultados similares fueron también reportados por Qiu y Chin (2021), quienes encontraron que los carotenoides presentes en el tomate mejoraron el color de hamburguesas de carne de puerco.

Por el contrario, el efecto de la CD sobre la disminución del color puede ser atribuido al color oscuro propio del fruto; este comportamiento es similar a lo reportado por Reyes-Padilla *et al.* (2018), donde la incorporación de 5 % CD en bolonia generó los valores L^* , a^* y b^* más bajos. De igual manera, Nuñez de Gonzalez *et al.* (2008), reportaron una disminución en los valores L^* , a^* y b^* en carne de bovino cuando la cantidad de CD en la formulación se incrementó de 2.5 % a 5 %.

pH, rendimiento por cocción y reducción de diámetro

El pH, RC y RD de las hamburguesas de carne de bovino estuvieron en los rangos de 4.97 - 5.49, 62.2 - 89.17 y 4.79 - 15.20, respectivamente (Tabla 2). Todos los modelos de regresión para pH, RC y RD fueron significativos ($p < 0.05$), con una R^2 aceptable y con una falta de ajuste mayor a 0.05 (Tabla 3), por lo cual son adecuados para predecir la variable de respuesta. La Figura 1 muestra los efectos y tendencias de las variables de proceso para el pH, RC y RD, respectivamente. El pH es un parámetro de calidad muy importante en la carne, ya que puede estar relacionado directa o indirectamente con otros parámetros de calidad como la capacidad de retención

Tabla 3. Modelos de regresión de los parámetros de calidad en el diseño de mezclas.

Table 3. Regression models of the quality parameters in the mixture design.

| VR | ^a Promedio ± DE | R ² | FA | Prob < p | Modelo de regresión |
|------------------------------------|----------------------------|----------------|------|----------|---|
| Color, pH y propiedades de cocción | | | | | |
| L^* | 39.40 ± 4.41 | 0.99 | 0.07 | < 0.0001 | 5.43 HL + 7.13 PM - 12.55 CD - 4.44 HL*CD - 8.18 PM*CD |
| a^* | 15.10 ± 2.65 | 0.92 | 0.51 | < 0.0001 | 0.88 HL + 5.89 PM - 6.77 CD |
| b^* | 17.20 ± 2.10 | 0.99 | 0.65 | < 0.0001 | 4.27 HL + 1.51 PM - 5.78 CD + 3.90 PM*CD |
| Rendimiento (%) | 78.10 ± 8.40 | 0.96 | 0.27 | < 0.0001 | 21.47 HL - 17.86 PM - 3.61 CD + 19.89 HL*PM + 22.51 HL*CD |
| Encogimiento (%) | 11.10 ± 2.60 | 0.76 | 0.47 | 0.0004 | - 6.56 HL + 3.50 PM + 3.06 CD |
| pH | 5.19 ± 0.15 | 0.98 | 0.83 | < 0.0001 | 0.42 HL - 0.10 PM - 0.31 CD |
| Análisis de perfil de textura | | | | | |
| Dureza (N) | 7.43 ± 2.53 | 0.89 | 0.61 | 0.0012 | - 4.95 HL + 3.20 PM + 1.75 CD - 14.01 HL*PM - 10.56 HL*CD - 11.09 PM*CD |
| Elasticidad (cm) | 0.66 ± 0.09 | 0.34 | 0.12 | 0.103 | - 0.15 HL + 0.14 PM + 0.02 CD |
| Cohesividad | 0.35 ± 0.04 | 0.83 | 0.56 | 0.0003 | - 0.10 HL + 0.06 PM + 0.04 CD - 0.18 HL*CD |
| Masticabilidad (N/cm) | 1.89 ± 1.06 | 0.89 | 0.28 | 0.0002 | - 2.25 HL + 1.81 PM + 0.44 CD - 6.37 HL*PM - 4.15 HL*CD |
| Propiedades sensoriales | | | | | |
| Sabor | 5.99 ± 1.65 | 0.96 | 0.06 | < 0.0001 | - 4.39 HL + 1.00 PM + 3.39 CD - 4.31 HL*CD |
| Textura | 7.15 ± 1.02 | 0.76 | 0.27 | 0.0004 | - 2.49 HL + 1.77 PM + 0.72 CD |
| Jugosidad | 5.72 ± 1.38 | 0.84 | 0.14 | < 0.0001 | - 3.66 HL + 1.91 PM + 1.75 CD |

VR = variable respuesta, FA = falta de ajuste, $0 < R^2 < 1$ (cercano a 1 más significativo), ^a Promedio de 6 determinaciones ± DE (desviación estándar), HL (harina de linaza), PM (pulpa de mango), CD (ciruela deshidratada), * $p < 0.05$

de agua, propiedades organolépticas y calidad microbiológica (Toldrá, 2003). De acuerdo a los modelos de regresión, la incorporación de PM y CD aumentó ($p < 0.05$) la acidez en las hamburguesas, mientras que la adición de HL la disminuyó. Los efectos de estos ingredientes sobre el pH del producto pueden atribuirse al pH propio de cada uno de ellos; por un lado, la PM y CD poseen un pH de 3.45 y 3.82, respectivamente, debido principalmente a la alta cantidad de ácidos orgánicos como cítrico y málico (Jarvis *et al.*, 2015; Maldonado-Celis *et al.*, 2019), razón por la cual al ser incorporados en el alimento le confieren un pH más ácido, mientras que la HL (pH = 6.42) le confiere al alimento un pH más alcalino. Yıldız-Turp y Serdaroglu (2010), reportaron que se observa una disminución de pH aumentando las proporciones de CD en hamburguesas de carne de bovino; de manera similar se ha reportado una disminución de pH en milanesas de pollo debido a un aumento en la adición de polvo de cáscara de mango (Bhat *et al.*, 2017). Los efectos anteriormente explicados se pueden apreciar en el gráfico de contorno de diseño de mezclas de la Figura 1, donde se observa que una mayor concentración de HL en la formulación del producto provoca una disminución de la acidez mientras que una mayor concentración de PM o CD ocasiona un aumento de la misma.

El RC y RD son parámetros tecnológicos importantes en productos cárnicos ya que determinan las características finales del alimento; éstos son función de la pérdida de agua y grasa del alimento por efecto de la temperatura de cocinado; a mayor pérdida de agua y grasa durante el cocimiento, menor será el RC y mayor la RD (Yıldız-Turp y Serdaroglu, 2010). El pH de cada ingrediente es uno de los aspectos importantes que hay que tomar en cuenta, pues éste influye directamente en la capacidad de retención de agua del producto. El bajo pH de la PM (pH = 3.45) y CD (pH = 3.82) tiene un efecto directo sobre el RC y RD, ya que mantiene a las proteínas miofibrilares de la carne cercanas a su punto isoeléctrico ($pI = 5.1-5.2$), que es donde la capacidad de retención de agua es mínima (Toldrá, 2003). Un efecto contrario se observa por la adición de HL (pH = 6.42). La PM produce un menor RC y una mayor RD debido a que al ser un ingrediente fresco (a diferencia de la CD) éste aporta una alta cantidad de agua al producto cárnico y promueve la pérdida de peso durante el proceso de cocinado. En Figura 1 se observa gráficamente como un mayor porcentaje de HL ocasiona un aumento del RC y una disminución de RD, mientras que un mayor porcentaje de PM o CD provoca una disminución del RC y un aumento de RD.

Análisis de perfil de textura

Los rangos registrados de dureza (N), elasticidad (cm) y masticabilidad (N/cm) oscilaron entre 4.4 – 13.1, 0.53 – 0.84 y 0.8 – 4.1, respectivamente (Tabla 2). En relación a la cohesividad, los valores fueron muy uniformes entre todos los tratamientos evaluados presentando un rango de 0.3 – 0.4. Todos los modelos de regresión para el perfil de textura fueron significativos ($p < 0.05$), con una R^2 aceptable y con una falta de ajuste mayor a 0.05 (Tabla 3), por lo cual los modelos son adecuados para predecir la variable de respuesta.

La representación gráfica de los modelos de regresión para el perfil de textura obtenidos de la matriz de diseño de mezclas se presenta en la Figura 2.

La textura de un producto cárnico es una de las características de calidad más importantes que determina su aceptación por parte del consumidor (Braña-Varela *et al.*, 2011). De acuerdo a los modelos obtenidos, la incorporación de HL disminuyó ($p < 0.05$) todos los valores de textura, lo que evidencia el detrimento provocado por este ingrediente sobre la calidad tecnológica del producto. El efecto negativo de este ingrediente en las propiedades de textura de hamburguesas de carne de bovino ha sido reportado también por Valenzuela-Melendres *et al.* (2014), quienes mencionan que la adición de más del 3 % de HL en la formulación causa un detrimento marcado en la textura del producto. Por otra parte, la PM y CD aumentaron los valores del perfil de textura ($p < 0.05$) en comparación a lo observado por la incorporación de HL. Ambos ingredientes presentaron un efecto muy similar en todos los parámetros de textura. El aumento de la dureza por la incorporación de PM y CD puede ser atribuido a los carbohidratos estructurales de estos frutos como agar, pectinas, almidón o carrageninas que pueden actuar como espesantes y gelificantes para mantener un producto más firme (Maldonado-Celis *et al.*, 2019; Serna-Cock *et al.*, 2016).

Análisis sensorial

La evaluación sensorial del sabor, textura y jugosidad oscilaron en los rangos de 3.42 – 8.68, 4.87 – 8.77 y 3.73 – 7.50, respectivamente (Tabla 2). Todos los modelos de regresión para los atributos sensoriales fueron significativos ($p < 0.05$), con una R^2 aceptable y con una falta de ajuste mayor a 0.05 (Tabla 3), por lo cual los modelos son adecuados para predecir la variable de respuesta. Un signo negativo en el modelo de regresión indica que a medida que se adiciona el ingrediente, la variable de respuesta disminuye; por el contrario, un signo positivo en el modelo indica que la variable de respuesta aumenta a medida que se incorpora el ingrediente.

Todas las propiedades sensoriales evaluadas aumentaron significativamente ($p < 0.05$) por la incorporación de CD y PM en la formulación cárnica, mientras que disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) por la incorporación de HL. Los efectos de PM, CD y HL, se observan visualmente en los gráficos de contorno de la Figura 3, donde una mayor incorporación de PM y CD resulta en un aumento en la textura, jugosidad y sabor del producto, mientras que un efecto contrario se obtiene con la adición de HL. La harina de linaza es un ingrediente con un bajo contenido de humedad (7 %), y que cuando se incorpora a los productos cárnicos imparte una sensación de resequeza, además contiene una alta cantidad de aceites poliinsaturados propensos a la oxidación que impactan en la textura, sabor y jugosidad de los productos cárnicos (Valenzuela-Melendres *et al.*, 2014). Por otro lado, los carbohidratos complejos como almidón y fibra en pulpa de mango pueden llegar hasta un 15 % y 1.6 %, respectivamente (Lebaka *et al.*, 2021); estos componentes pueden actuar como espesantes y gelificantes al incorporar-

se en la formulación cárnica, favoreciendo su textura. Por su parte, la ciruela deshidratada es rica en compuestos humectantes como el sorbitol cuyo contenido puede ser de hasta 21.7 %, según su origen (Gill *et al.*, 2019), y que de manera natural disminuye la sensación de resequeza al masticar de formulaciones cárnicas que la contiene, favoreciendo la textura y jugosidad del producto. Además, la ciruela deshidratada imparte notas aromáticas y dulces a los productos cárnicos, lo que incrementa los valores del sabor en la evaluación sensorial (Nuñez de Gonzalez *et al.*, 2009). Resultados similares a nuestro estudio fueron obtenidos por Yıldız-Turp y Serdaroglu (2010), quienes reportaron un incremento en la textura, jugosidad y sabor de hamburguesas de carne de bovino a las que se les incorporó hasta un 10 % de puré de ciruela en la formulación.

Optimización de hamburguesas de carne de bovino y validación de modelos

Durante el proceso de optimización se establecen las condiciones que satisfacen simultáneamente los requerimientos de calidad que se deseen en el producto (Baugreet *et al.*, 2017), siendo la función de deseabilidad uno de los enfoques más populares para lograr dicha optimización. En el presente estudio, se utilizó la herramienta de optimización numérica del software Desing Expert para estimar la combinación óptima de pulpa de mango, ciruela deshidratada y harina de linaza que maximizan las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de hamburguesas de carne de bovino. La combinación óptima de estos ingredientes se logró cuando se alcanzó la máxima deseabilidad. En el proceso de optimización no se tomó en cuenta la propiedad de elasticidad del APT debido a que el modelo no fue significativo ($p = 0.103$) y presentó una R^2 muy baja (0.34). La formulación óptima de hamburguesa de carne de bovino resultante incluyó 6 % HL, 10.5 % PM y 3.5 % CD, con una deseabilidad de 0.506. Los valores predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente para la formulación óptima de hamburguesas de carne de bovino se presentan en la Tabla 4. De acuerdo al análisis estadístico realizado, los valores predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente para la formulación óptima fueron similares ($p > 0.05$), por lo tanto, las ecuaciones de regresión obtenidas son adecuadas para estimar las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de hamburguesas de carne de bovino adicionadas con pulpa de mango, ciruela deshidratada y harina de linaza.

Composición proximal y perfil de ácidos grasos de la formulación óptima

Se preparó un lote de hamburguesas con la formulación optimizada y se comparó con una hamburguesa típica con 20 % de grasa en términos de composición proximal y perfil de ácidos grasos. Los resultados de esta comparación se muestran en la Tabla 5. En cuanto a la composición proximal, se observa que no hubo diferencias ($p > 0.05$) entre los tratamientos evaluados, respecto al contenido de proteínas

Tabla 4. Valores experimentales y valores predichos de hamburguesas de carne de bovino optimizadas en sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

Table 4. Experimental and predicted values of beef patties optimized in their physicochemical and sensory properties.

| Respuesta | Valor predicho | IC 95% | Valor experimental* |
|---|----------------|-------------|---------------------|
| <i>Color, pH y propiedades de cocción</i> | | | |
| L^* | 41.1 | 40.8 – 41.5 | 41.44 |
| a^* | 16.6 | 16.0 – 17.2 | 16.00 |
| b^* | 18.1 | 17.9 – 18.2 | 18.14 |
| Rendimiento por cocción (%) | 77.9 | 75.7 – 80.1 | 78.33 |
| Reducción de diámetro (cm) | 11.3 | 10.4 – 12.3 | 11.67 |
| pH | 5.20 | 5.19 – 5.21 | 5.24 |
| <i>Análisis de perfil de textura</i> | | | |
| Dureza (N) | 5.87 | 4.61 – 7.13 | 7.03 |
| Cohesividad | 0.35 | 0.34 – 0.37 | 0.35 |
| Masticabilidad (N/cm) | 1.47 | 0.99 – 1.94 | 1.43 |
| <i>Propiedades sensoriales</i> | | | |
| Sabor | 5.80 | 5.54 – 6.06 | 5.74 |
| Textura | 7.36 | 6.97 – 7.74 | 7.44 |
| Jugosidad | 5.86 | 5.43 – 6.29 | 5.55 |

Promedio de 5 determinaciones.

y ceniza, oscilando éstos entre 15.96 a 17.04 % y 1.48 a 1.55 %, respectivamente. La humedad de la hamburguesa optimizada fue mayor que aquella que contiene 20 % de grasa de res, debido principalmente al contenido de humedad que le imparte la pulpa de mango (82 % de humedad). El contenido de grasa de la hamburguesa optimizada fue de 10.23 %, una reducción del 48 % respecto a la hamburguesa típica. La mayor parte de la grasa en la hamburguesa optimizada proviene de la adición de harina de linaza (31 % de lípidos), lo que significa un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido α -linoléico.

De acuerdo al perfil de ácidos grasos, mostrados en la Tabla 5, el contenido de ácidos grasos saturados y mono insaturados fue menor en la formulación óptima debido a un menor contenido de ácido palmítico (C16:0) y oleico (18:1 n9 cis), respectivamente. Además, se observa un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la formulación óptima, principalmente por un aumento en el contenido de ácido linoleico (C18:2 n9 cis) y ácido linoléico (C18:3 n3), siendo este último el ácido graso principal de la familia omega-3. Se ha comprobado que cuando éste es consumido como parte de la dieta trae múltiples beneficios a la salud, destacando una disminución de las ECV (Yue *et al.*, 2020). La hamburguesa optimizada puede ser más atractiva al consumidor al presentar un mejor perfil de ácidos grasos en su composición sin demérito en sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

Tabla 5. Análisis proximal y perfil de ácidos grasos de la hamburguesa optimizada y su comparación con una hamburguesa típica con 20 % de grasa. **Table 5.** Proximal analysis and fatty acid profile of the optimized beef patties and comparison with a typical beef patty with 20% fat.

| | Tratamientos | | Valor p |
|--------------------------------|---------------------|-------------------------|---------|
| | Testigo (20% grasa) | ^a Optimizada | |
| Análisis proximal | | | |
| Humedad | 63.42 ± 0.28 | 67.91 ± 0.28 | <0.001 |
| Grasa | 19.55 ± 0.16 | 10.23 ± 0.12 | <0.001 |
| Proteína | 15.96 ± 0.51 | 17.04 ± 0.64 | 0.257 |
| Ceniza | 1.48 ± 0.04 | 1.55 ± 0.02 | 0.267 |
| Perfil de ácidos grasos | | | |
| C12:0 | 0.08 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 0.395 |
| C14:0 | 2.36 ± 0.23 | 1.46 ± 0.03 | 0.060 |
| C15:0 | 0.25 ± 0.02 | 0.25 ± 0.01 | 0.977 |
| C16:0 | 23.80 ± 1.85 | 15.36 ± 0.00 | 0.044 |
| C17:0 | 0.68 ± 0.07 | 0.79 ± 0.00 | 0.245 |
| C18:0 | 12.36 ± 0.80 | 11.14 ± 0.15 | 0.273 |
| Σ AGS | 39.52 ± 2.95 | 29.05 ± 0.09 | 0.041 |
| C14:1 | 0.96 ± 0.09 | 0.26 ± 0.01 | 0.017 |
| C15:1 | 0.42 ± 0.03 | 0.51 ± 0.00 | 0.098 |
| C16:1 | 4.59 ± 0.48 | 1.64 ± 0.03 | 0.026 |
| C17:1 | 0.66 ± 0.06 | 0.56 ± 0.01 | 0.234 |
| C18:1 n9 <i>cis</i> | 42.82 ± 2.48 | 31.80 ± 0.12 | 0.047 |
| Σ AGM | 49.45 ± 3.14 | 34.78 ± 0.16 | 0.043 |
| C18:2 n6 <i>cis</i> | 4.14 ± 1.27 | 10.50 ± 0.04 | 0.037 |
| C18:3 n3 | 0.38 ± 0.00 | 23.42 ± 0.09 | < 0.001 |
| C20:3 n6 | 0.52 ± 0.01 | 0.67 ± 0.03 | 0.029 |
| Σ AGP | 5.04 ± 1.27 | 34.60 ± 0.16 | 0.002 |

AGS = ácidos grasos saturados, AGM = ácidos grasos monoinsaturados, AGP = ácidos grasos poliinsaturados. ^a Hamburguesa optimizada: 6 % HL, 10.5 % PM y 3.5 % CD.

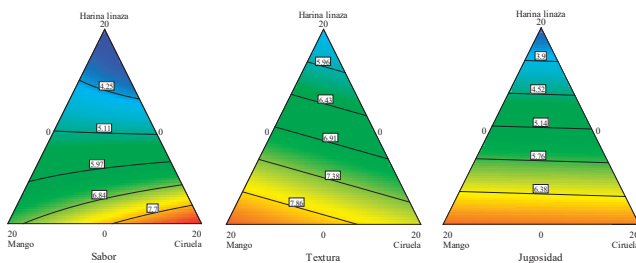


Figura 3. Gráfico de contorno de diseño de mezclas para atributos sensoriales: sabor, textura y jugosidad de hamburguesas de carne de bovino adicionadas con HL, PM y CD. **Figure 3.** Mixture design contour plot for sensory attributes: flavor, texture and juiciness of beef patty added with FS, MP and DP.

CONCLUSIONES

El detrimento en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales observadas en estudios previos por la adición de harina de linaza en hamburguesas de carne de bovino fue disminuido por la inclusión de pulpa de mango y ciruela deshidratada. La combinación óptima de los ingredientes que resultó en un producto con propiedades fisicoquímicas y sensoriales aceptables fue de 6 % HL, 10.5 % PM y 3.5 % CD. El uso de pulpa de mango y ciruela deshidratada en hamburguesas de carne de bovino, permitió duplicar el contenido de harina de linaza reportado en investigaciones anteriores, además de aumentar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido linoleico y ácido linolénico. La harina de linaza, pulpa de mango y ciruela deshidratada son ingredientes con gran potencial para el desarrollo de productos cárnicos con una connotación más saludable. Investigaciones para determinar los efectos en la salud del consumidor son necesarios. Es importante también precisar que este tipo de productos no son la solución a los problemas de salud derivados de una mala alimentación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al primer autor durante sus estudios de Maestría en Ciencias.

REFERENCIAS

AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. In *Association of Analytical Chemists*. 15th ed.). Washington, DC.

Baugreet, S., Kerry, J. P., Allen, P., Hamill, R. M. 2017. Optimisation of protein-fortified beef patties targeted to the needs of older adults: a mixture design approach. *Meat Science*. 134: 111-118.

Bhat, A., Kumar, A., Sheikh, S., Dar, M., Haq, Z. 2017. Utilisation of mango peel powder as phytopreservative in the refrigeration storage of chicken cutlets. *International Journal of Livestock Research*. 7: 90-99.

Bilek, A. E., Turhan, S. 2009. Enhancement of the nutritional status of beef patties by adding flaxseed flour. *Meat Science*. 82: 472-477.

Botez, E., Nistor, O. V., Andronoiu, D. G., Mocanu, G. D., Ghinea, I. O. (2017). Meat product reformulation: Nutritional benefits and effects on human health. In *Functional Food-Improve Health through Adequate Food*. London (UK). Intech Open. 167-184.

Bourne, M. C. 1978. Texture profile analysis. *Food Technology*. 32: 62-66.

Braña-Varela, D., Rodríguez, E., Lozano, M., Sanchez-Escalante, A., Torrescano-Urrutia, G., Arenas de Moreno, M., Partida de la Peña, J., Ponce-Alquicira, E., Rios-Rincón, F. (2011). Manual de calidad en muestras de carne <http://www.anetif.org/files/pages/0000000034/03-manual-de-analisis-decalidad-en-muestras-de-carne.pdf>

Claus, J. R. (1995). *Methods for the objective measurement of meat product texture*. Paper presented at the Reciprocal Meat Conference Proceedings.

Cofrades, S., Serrano, A., Ayo, J., Solas, M. T., Carballo, J., Colmenero, F. J. 2004. Restructured beef with different

- proportions of walnut as affected by meat particle size. *European Food Research and Technology*. 218: 230-236.
- Comecarne. (2021). Consejo Mexicano de la Carne. Compendio estadístico 2021. En: <https://comecarne.org/>
- do Prado, M., Queiroz, V., da Veiga Correia, V., Neves, E., Ronchetti, E., Gonçalves, A., de Menezes, C., de Oliveira, F. 2019. Physicochemical and sensorial characteristics of beef burgers with added tannin and tannin-free whole sorghum flours as isolated soy protein replacer. *Meat Science*. 150: 93-100.
- Domínguez-Vara, I., Mondragón-Ancelmo, J. 2018. Factores determinantes para el consumo de la carne de bovino en los estados de México y Michoacán. *Avances de la Investigación Sobre Producción Animal y Seguridad Alimentaria en México*: 1267.
- Gill, S. K., Lever, E., Emery, P. W., Whelan, K. 2019. Nutrient, fibre, sorbitol and chlorogenic acid content of prunes (*Prunus domestica*): an updated analysis and comparison of different countries of origin and database values. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 70: 924-931.
- Jarvis, N., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., Crandall, P. G. 2015. The functionality of plum ingredients in meat products: A review. *Meat Science*. 102: 41-48.
- Keenan, D. F., Resconi, V. C., Kerry, J. P., Hamill, R. M. 2014. Modelling the influence of inulin as a fat substitute in comminuted meat products on their physico-chemical characteristics and eating quality using a mixture design approach. *Meat Science*. 96: 1384-1394.
- Lebaka, V., Wee, Y., Ye, W., Korivi, M. 2021. Nutritional composition and bioactive compounds in three different parts of mango fruit. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18: 741.
- Maldonado-Celis, M. E., Yahia, E. M., Bedoya, R., Landázuri, P., Loango, N., Aguillón, J., Restrepo, B., Guerrero Ospina, J. C. 2019. Chemical composition of mango (*Mangifera indica* L.) fruit: Nutritional and phytochemical compounds. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1073.
- Nuñez de Gonzalez, M., Hafley, B., Boleman, R., Miller, R., Rhee, K., Keeton, J. 2008. Antioxidant properties of plum concentrates and powder in precooked roast beef to reduce lipid oxidation. *Meat Science*. 80: 997-1004.
- Nuñez de Gonzalez, M., Hafley, B., Boleman, R., Miller, R., Rhee, K., Keeton, J. 2009. Qualitative effects of fresh and dried plum ingredients on vacuum-packaged, sliced hams. *Meat Science*. 83: 74-81.
- Qiu, Z. Z., Chin, K. B. 2021. Physicochemical properties and shelf-life of raw and cooked patties added with various levels of grape tomato powder by different drying methods. *LWT-Food Science and Technology*. 146: 111415.
- Reyes-Padilla, E., Valenzuela-Melendres, M., Camou, J. P., Sebranek, J. G., Alemán-Mateo, H., Dávila-Ramírez, J. L., Cumplido-Barbeitia, G., González-Ríos, H. 2018. Quality evaluation of low fat bologna-type meat product with a nutritional profile designed for the elderly. *Meat Science*. 135: 115-122.
- Selani, M. M., Shirado, G. A., Margiotta, G. B., Rasera, M. L., Marabesi, A. C., Piedade, S. M., Contreras-Castillo, C. J., Canniatti-Brazaca, S. G. 2016. Pineapple by-product and canola oil as partial fat replacers in low-fat beef burger: Effects on oxidative stability, cholesterol content and fatty acid profile. *Meat Science*. 115: 9-15.
- Serna-Cock, L., García-Gonzales, E., Torres-León, C. 2016. Agro-industrial potential of the mango peel based on its nutritional and functional properties. *Food Reviews International*. 32: 364-376.
- SIAP. (2021). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Escenario mensual de productos agroalimentarios En: <https://www.gob.mx/siap/documentos/escenarios-de-productos-agroalimentarios-266425>.
- Szerman, N., Ferrari, R., Sancho, A. M., Vaudagna, S. 2019. Response surface methodology study on the effects of sodium chloride and sodium tripolyphosphate concentrations, pressure level and holding time on beef patties properties. *LWT-Food Science and Technology*. 109: 93-100.
- Toldrá, F. 2003. Muscle foods: water, structure and functionality. *Food Science and Technology International*. 9: 173-177.
- Torres-León, C., Rojas, R., Contreras-Esquivel, J. C., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R. E., Aguilar, C. N. 2016. Mango seed: Functional and nutritional properties. *Trends in Food Science & Technology*. 55: 109-117.
- Valenzuela-Melendres, M., Camou, J., Torrentera-Olivera, N., Álvarez-Almora, E., González-Mendoza, D., Avendaño-Reyes, L., González-Ríos, H. 2014. Response surface methodology for predicting quality characteristics of beef patties added with flaxseed and tomato paste. *Meat Science*. 97: 54-61.
- Valenzuela-Melendres, M., Camou, J., Torrentera-Olivera, N., Viuda-Martos, M., González-Ríos, H. 2018. Nutritional quality of beef patties with added flaxseed and tomato paste. *CyTA-Journal of Food*. 16: 263-270.
- Wongkaew, M., Sommano, S. R., Tangpao, T., Rachtanapun, P., Jantanasakulwong, K. 2020. Mango peel pectin by microwave-assisted extraction and its use as fat replacement in dried Chinese sausage. *Foods*. 9: 450.
- Yıldız-Turp, G., Serdaroglu, M. 2010. Effects of using plum puree on some properties of low fat beef patties. *Meat Science*. 86: 896-900.
- Yue, H., Qiu, B., Jia, M., Liu, W., Guo, X., Li, N., Xu, Z., Du, F., Xu, T., Li, D. 2020. Effects of α -linolenic acid intake on blood lipid profiles: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 1-17.

Influencia de la separación de agua residual porcina en fracciones sólida y líquida, en la producción de metano con lodo anaerobio granular y disperso

Influence of swine wastewater separation into solid and liquid fractions, on methane production with granular and disperse sludge

Valdez-Vázquez M¹, Bobadilla-Vidrio YG¹, García-Reyes RB², Martínez-Rodríguez CM³, Alvarez-Valencia LH^{4*}

¹ Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Antonio Caso 2266, C.P. 85130 Villa ITSON, Cd. Obregón, Sonora, México.

² Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas. Av. Universidad S/N, 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

³ Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias. Lateral Av. Salvador Nava Martínez S/N, Zona Universitaria, San Luis Potosí, SLP, 78290, México.

⁴ Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Antonio Caso 2266, C.P. 85130 Villa ITSON, Cd. Obregón, Sonora, México.

RESUMEN

Las estrategias actuales de tratamiento de efluentes porcinos en México son en muchos casos poco eficientes, que se traduce en la descarga de aguas tratadas parcialmente y no tratadas, así como el desaprovechamiento de un recurso energético. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la separación sólida-líquida del agua residual porcina sobre la producción de metano, utilizando lodo granular y lodo disperso, bajo tres concentraciones. La concentración de DQO en el efluente crudo (EC) fue de 13,640 mg/L, con 69 % correspondiente a la fracción sólida (FS) y el resto para la fracción líquida (FL). Los resultados indican que los cultivos con la FS produjeron una mayor cantidad de metano, incrementándose 1.47, 1.31 y 1.22 veces en comparación al EC, para las concentraciones de 3, 6 y 9 g SSV/L de lodo disperso. La estrategia de separación sólida-líquida resultó en incrementos en la producción de metano, evidenciado porque la suma del metano acumulado por la FS y FL fue entre 2.14 y 2.28 veces mayor que la cantidad obtenida por el EC. La aplicación de procesos anaerobios para tratar residuos sólidos y líquidos permitirá recuperar de manera más eficiente la energía a partir de la transformación de la materia orgánica a metano.

Palabras clave: agua residual porcina, metano, separación de sólidos, lodo granular, lodo disperso

ABSTRACT

In most cases, the current strategies to treat swine effluents in Mexico are not efficient, resulting in the discharge of partially treated wastewater, wasting an energy resource. This study aimed to evaluate the impact of the solid-liquid separation of swine wastewater on methane production using granular (GS) and disperse sludge (DS), under three concentrations. The COD concentration in the raw effluent (RE) was 13,640 mg/L, which corresponds up to

69 % to the solid fraction (SF), and the remaining to the liquid fraction (LF). The results indicate that the cultures with the SF produced the higher cumulative methane, increasing 1.47-, 1.31-, and 1.22-times in retaliation to the RE, at 3, 6, and 9 g VSS/L of DS. The solid-liquid separation strategy resulted in a higher methane production, evidenced by the amount of methane obtained by the SF and LF, which was, respectively, 2.14- and 2.28-times higher than the obtained by the RE. The application of anaerobic processes to treat solid and liquid wastes will allow to recovery efficiently the energy from the transformation of organic matter into methane.

Key words: swine wastewater, methane, solid separation, granular sludge, disperse sludge

INTRODUCCIÓN

México se ubica en la novena posición a nivel mundial en producción de carne de cerdo con una participación de 1.4 % en el año 2019, alcanzando 1.6 millones de toneladas de carne en canal y crecimiento anual de 4.9%. La producción en el año 2019 se concentra en seis entidades del país que en conjunto producen 77.1 %: Jalisco (21.4 %), Sonora (19.3 %), Puebla (10.7 %), Yucatán (9.2 %), Veracruz (8.9 %) y Guanajuato (7.7 %). Los principales municipios a nivel nacional son Navojoa, Hermosillo y Cajeme, los tres ubicados en Sonora, con una producción cercana a 10,000 millones de pesos (FIRA, 2020).

De manera paralela al beneficio económico, la producción intensiva de carne de cerdo se ha asociado a diferentes problemas ambientales que comprometen la calidad del agua, suelo y aire, tales como eutrofización, acidificación, cambio de uso de suelo y cambio climático (Dourmad *et al.*, 2014). El principal desecho generado por esta actividad son las aguas residuales, que se caracterizan por contener altas concentraciones de materia orgánica, sólidos totales, nitrógeno y fósforo (Boursier *et al.*, 2005) y hormonas (Hanselman *et al.*, 2003). La concentración de materia orgánica en

*Autor para correspondencia: Luis H. Alvares Valencia
 Correo electrónico: luis.alvarez@itson.edu.mx

Recibido: 15 de julio de 2021

Aceptado: 7 de enero de 2022

las aguas residuales varía según el tamaño de la granja, alcanzando entre 3,500 y 9,300 mg DQO/L en granjas pequeñas (hasta 2,500 cerdos) y entre 34,000 y 40,500 mg DQO/L en granjas grandes ($\geq 8,000$ cerdos) (Garzón-Zúñiga y Buelna, 2014). La cantidad de materia orgánica en este tipo de efluentes representa un potencial grande de ser utilizado como fuente de energía alterna mediante la obtención de biogás utilizando digestión anaerobia. En una estimación hecha considerando la capacidad instalada de crianza de cerdos en el estado de Sonora, arrojó que la cantidad de residuos que potencialmente se pueden generar permitiría la generación de $127,638 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{día}$, que equivale a 525,216 kWh (Alvarez *et al.*, 2019).

A pesar del potencial, los esfuerzos para recuperar la energía a partir de los residuos porcinos son escasos o nulos, lo cual es evidenciado por la carencia o ineficiencia de los sistemas de tratamientos en México. En la mayoría de los casos, los sistemas que se han instalado en las granjas son: 1) fosa de homogenización, 2) digestor anaerobio de una mezcla de líquidos y sólidos, 3) lagunas facultativas o de otro tipo, o bien una combinación de estos procesos (Garzón-Zúñiga y Buelna, 2014). Además, en la mayoría de los sistemas donde hay producción de biogás, en los casos que se utiliza un proceso anaerobio, no se aprovecha para la generación de calor o electricidad. Para mejorar el proceso de digestión anaerobia y en consecuencia la recuperación de energía a partir de los residuos porcinos en México, es necesario implementar sistemas de tratamiento como los reactores anaerobios de flujo ascendente (tipo UASB) o reactores completamente mezclados (tipo CSTR). Sin embargo, el proceso de digestión anaerobia también presenta algunas limitaciones debido a la naturaleza del sustrato y en general de los componentes del agua residual porcina. Por ejemplo, la hidrólisis, paso inicial de la digestión anaerobia, es comúnmente afectada por la presencia de sólidos orgánicos complejos, en tanto la metanogénesis puede limitarse por la disponibilidad de sustratos orgánicos solubles (Tomei *et al.*, 2009). En estudios previos se ha observado que la estrategia de separar los sólidos de los efluentes y su posterior tratamiento mediante procesos anaerobios, ha mejorado la digestión de la fracción sólida (FS) (Cestonaro do Amaral *et al.*, 2016) y la fracción líquida (FL) (Yang *et al.*, 2015). Este comportamiento puede estar influenciado por la presencia de compuestos inhibitorios en los residuos. Sin embargo, en esos estudios no establecen una comparación con el tipo y concentración de inóculo utilizado. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la separación sólida-líquida del agua residual de una granja porcina sobre la producción de metano, utilizando cultivos en lote inoculados con distintas concentraciones de lodo granular y lodo disperso, para su aplicación en reactores UASB y CSTR, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Agua residual porcina e inóculo anaerobio

La muestra de agua residual se colectó en una granja porcina ubicada en el municipio de BÁCUM, Sonora. Una por-

ción del efluente crudo (EC) fue centrifugada a 4,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante representa la FL y el sedimento colectado fue resuspendido en la porción de agua destilada que representa a la FL para mantener la concentración inicial, y esta fracción representa a la FS. Las tres muestras fueron analizadas para determinar la DQO y pH, utilizando métodos reportados en standard methods (APHA, 2005). Se utilizó lodo granular metanogénico como inóculo que fue colectado de un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB), instalado en una industria cervecera localizada en Cd. Obregón Sonora. Una porción del lodo granular, con tamaño de gránulo de 2-4 mm, fue disgregado con un tamiz de 0.3 mm para obtener el lodo disperso. Ambos lodos contenían 9.5 % de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y no fueron previamente aclimatados en aguas residuales porcinas u otra condición en el laboratorio.

Cultivos en lote para producción de metano

Las cinéticas de producción de metano se realizaron por triplicado en botellas serológicas de 120 mL con un volumen de trabajo de 50 mL de cada una de las fracciones de agua residual. Las concentraciones de lodo granular disperso utilizadas como inóculo fueron 3, 6 y 9 g SSV/L. Se utilizó un tapón de hule y arillo de aluminio para sellar los cultivos; después, se utilizó gas helio para desplazar el aire (oxígeno) del espacio de cabeza de cada botella, a fin de crear condiciones anaerobias y promover la metanogénesis. Posteriormente, las botellas se colocaron en una incubadora con agitación a 40 °C y 150 rpm. Periódicamente, durante los 30 días que duró la incubación se midió el volumen de metano producido utilizando el método de desplazamiento de líquido, con una solución de NaOH al 2 % que permite la solubilidad del CO_2 .

Los valores experimentales de producción metano fueron utilizados para determinar los parámetros cinéticos del proceso mediante el modelo modificado de Gompertz:

$$M(t) = M_{max} * \exp \left[- \exp \left[\frac{2.71828 * R_{max}}{M_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right]$$

donde $M(t)$ es el volumen (mL) de metano en un tiempo determinado, t es el tiempo (días), M_{max} es la cantidad máxima de metano producido (mL), R_{max} es la tasa máxima de producción de metano (mL/día) y λ es la fase lag (días). Tanto los parámetros del modelo Gompertz, así como un análisis de varianza y prueba Tukey se realizaron con Minitab 19 para determinar diferencias entre las medias ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de la separación sólida-líquida sobre la DQO y pH

El agua residual y sus fracciones fueron analizadas para determinar el contenido de materia orgánica expresado como DQO (Tabla 1). La concentración de materia orgánica en el EC fue de 13,640.0 mg DQO/L. De esta concentración, el 69 % corresponde a la FS (9,413 mg DQO/L) y el porcentaje restante corresponde a la FL (3,685 mg DQO/L). La suma de la

Tabla 1. Contenido de materia orgánica expresada como DQO y valores de pH para los diferentes tipos a agua residual.

Table 1. Organic matter content determined as COD and pH values for the three types of wastewaters.

| Tipo de agua | DQO (mg/L) | pH |
|------------------|------------------|-----|
| Efluente crudo | 13640.0 ± 1501.7 | 6.8 |
| Fracción sólida | 9413.3 ± 1759.7 | 6.5 |
| Fracción líquida | 3685.0 ± 157.4 | 6.6 |

DQO determinada en las FC y FL corresponde en general a la DQO total en el EC. La concentración de DQO en este tipo de efluentes es muy variable, presentando valores desde 6,000 a 50,000 mg/L (Boursier *et al.*, 2005), por lo que la muestra utilizada en este estudio contiene una DQO que se ubica en un rango bajo. Resulta interesante el hecho de que la eliminación física de los sólidos contenidos en el agua bajo estudio puede disminuir hasta el 69 % de la DQO, lo que se traduce en un agua que puede ser más fácilmente tratada. Actualmente en México son inexistentes o casi nulas las estrategias de tratamiento primario en granjas de cerdo encaminadas a eliminar sólidos mediante procesos de separación física. Normalmente los efluentes se conducen hacia los tratamientos secundarios en donde se utilizan lagunas anaerobias o facultativas medianamente tecnificadas (Garzón-Zúñiga y Buena, 2014). Por otro lado, la separación sólido-líquida no tuvo un efecto considerablemente importante sobre el pH, ya que el valor en el EC fue 6.8 y bajó a 6.5 en la FS y a 6.6 en la FL. Esta ligera disminución en el pH pudiera no representar

un efecto adverso sobre los microorganismos involucrados en la metanogénesis, puesto que el rango óptimo de pH para que este proceso ocurra es 6.8 a 7.2, pero puede tolerar de 6.5 hasta 8.0 (Cioabla *et al.*, 2012).

Influencia de la separación sólida-líquida sobre la producción de metano

La producción de metano a partir de la digestión anaerobia de la materia orgánica contenida en el agua residual porcina ocurrió bajo todas las condiciones probadas (Figura 1). La mayor cantidad de metano acumulado fue con la FS, seguida por el EC y la FL, ocurrida bajo las tres concentraciones de inóculo probadas. Por ejemplo, con el lodo disperso y utilizando la FS se obtuvo 1.47, 1.31 y 1.22 veces más metano acumulado que lo obtenido con el EC, para 9, 6 y 3 g SSV/L, respectivamente. Además, en los tres tipos de agua residual, los valores acumulados de metano resultaron más altos con el lodo disperso en comparación con el lodo granular. La concentración de inóculo impactó la producción de metano. Por ejemplo, el metano producido con la FS utilizando lodo disperso a 9 g SSV/L fue 318.8 mL, que es 1.12- y 1.27-veces más alto a lo obtenido con 6 y 3 g SSV/L, respectivamente, después de 26 h de incubación. Para el EC y la FL también hubo una mejor producción de metano con el lodo disperso a 9 g SSV/L en comparación con las otras dos concentraciones, pero por debajo a los valores obtenidos con la FS. Los resultados con el lodo granular fueron similares entre las tres concentraciones de inóculo probadas (Figura 1); es decir la

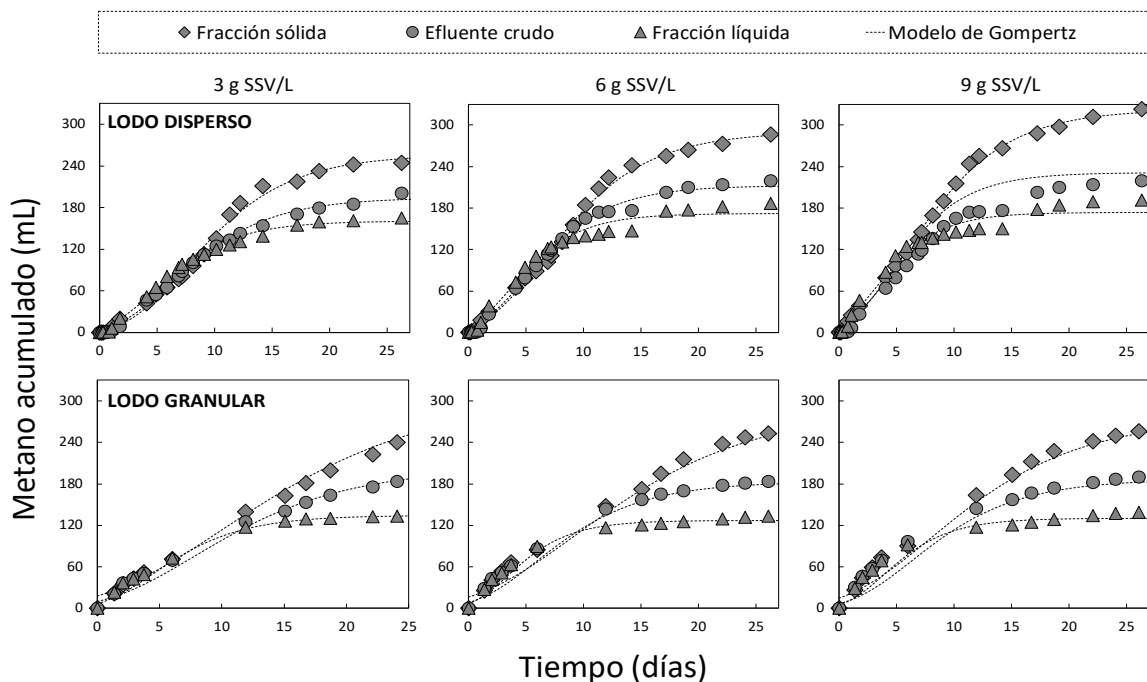


Figura 1. Producción de metano acumulado durante la digestión anaerobia de los tres tipos de agua residual porcina en presencia de diferentes concentraciones de lodo granular y lodo disperso.

Figure 1. Cumulative methane production during the anaerobic digestion of the three types of swine wastewater in the presence of different concentrations of granular and disperse sludge.

cantidad de metano acumulado tuvo una diferencia entre los tratamientos no mayor a ~7 mL para las concentraciones de lodo granular según cada fracción. La producción de metano con la FS a 9 g SSV/L fue 1.26 veces mayor con el lodo granular (318.8 mL) en comparación a lo obtenido con el lodo granular (253.6 mL). En general, este comportamiento se mantuvo a 3 y 6 g SSV/L de lodo metanogénico, pero en proporción menor a lo observado con la concentración de 9 g SSV/L.

El consumo de la materia orgánica contenida en las diferentes fracciones se muestra en la Figura 2. En general, la eficiencia de consumo, expresada como DQO, fue mayor utilizando el lodo disperso en relación con el lodo granular. Sin embargo, el análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre algunas condiciones probadas. Por ejemplo, para los cultivos con el EC, la eficiencia alcanzó ~75 % con ambos lodos, y no se presentaron diferencias significativas, con excepción de la concentración a 3 g SSV/L con el lodo disperso, que alcanzó 85 % y que es estadísticamente diferente al resto. Los cultivos con la FS fueron en los que se presentaron las eficiencias de consumo de DQO más bajas, con valores que van desde 47.5 % a 63.8 %. En este tipo de agua residual el consumo de DQO con el lodo granular no mostró diferencia estadística entre las tres concentraciones de inóculo, pero si fueron estadísticamente diferentes con los resultados obtenidos con el lodo disperso inoculados con 3 y 6 g SSV/L, alcanzando valores de consumo más altos (Figura 2). En los cultivos con la FL las eficiencias de consumo de DQO tuvieron un rango entre 71 % a 89 %, alcanzándose los

valores más altos para la concentración de 3 g SSV/L, tanto para el cultivo con el lodo granular y disperso, en donde no hay diferencia estadística significativa entre sus medias.

La separación sólida-líquida en el efluente porcino y su posterior tratamiento por digestión anaerobia incrementó la producción de metano (Figura 1). En estudios previos se ha observado que el rendimiento de metano se incrementó hasta 1.18 veces con la FS en relación a otras fracciones, utilizando aguas residuales de granjas de gestación y engorda (Cestonaro do Amaral *et al.*, 2016), este incremento está por debajo del alcanzado en este estudio, que fue de hasta 1.47 veces mayor. Este resultado es esperado, ya que la muestra de agua residual con la FS contiene una mayor cantidad de materia orgánica en comparación a la FL (Tabla 1), lo cual es típico en los efluentes provenientes de granjas porcinas (Kebede-Westhead *et al.*, 2006; Vanotti *et al.*, 2018). Sin embargo, en otras muestras de agua residual porcina se ha encontrado que la FL, en la cual previamente se eliminó el material floculante, fue la más apropiada para producir metano en términos de rendimiento (Rico *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). Esta diferencia en los resultados puede ser atribuida a la forma en la cual se utilizó la FS en el presente estudio, en donde la re-suspensión de los sólidos en el agua ocasionó que una fracción de la materia orgánica, que no necesariamente formaba parte de material particulado, contribuyó a tener una cantidad de DQO en forma soluble. Por otra parte, la presencia de antibióticos de uso veterinario en el agua residual porcina también puede ser responsable de inhibir la producción de metano, tanto en muestras con o sin sólidos.

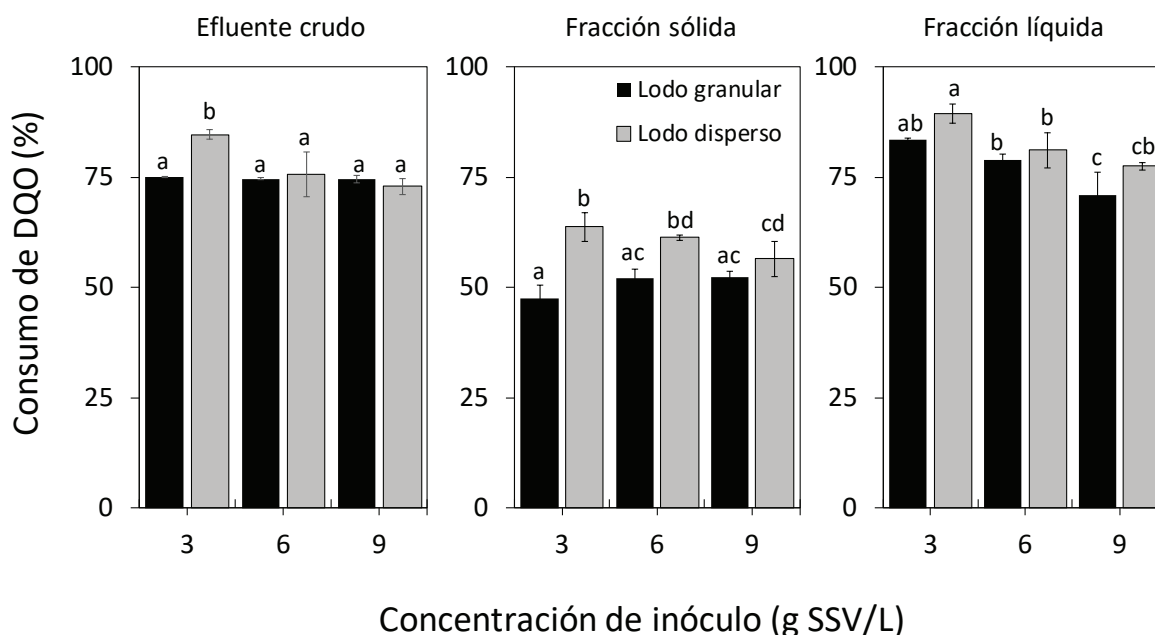


Figura 2. Eficiencia de consumo de DQO en los cultivos con las diferentes muestras de agua residual porcina y concentraciones de inóculo. Letras diferentes arriba de cada barra indican diferencia significativa en las medias ($P < 0.05$), según el tipo de agua residual utilizada.

Figure 2. COD consumption efficiency in the cultures with the different samples of swine wastewater and inoculum concentrations. Different letters on each bar indicates a significant difference in means ($P < 0.05$), according to the type of wastewater used.

Esto se debe a que la naturaleza química de ciertos antibióticos les permite tener mayor capacidad de solubilizarse en el agua, pero a otros una mayor afinidad de ser adsorbidos en el material particulado (Van Epps y Blaney, 2016); lo que puede influir en la cantidad de metano que se produce a partir de las fracciones sólidas y líquidas.

Parámetros cinéticos a partir de modelo de Gompertz

La estrategia de separación del efluente porcino en fracciones sólida y líquida, así como las distintas condiciones del inóculo tuvieron un impacto sobre la fase lag, M_{max} y R_{max} , obtenidas con el modelo de Gompertz (Tabla 2). En general,

para los tres tipos de agua residual, los valores de M_{max} con el lodo disperso fueron más altos que con el lodo granular, sin embargo, en algunos casos no hay diferencia estadística significativa entre los tipos de lodo usado. También, el resultado de M_{max} fue mayor utilizando la FS, aun cuando esta fracción tiene una concentración de DQO menor a la del EC. El valor de M_{max} con el EC y utilizando lodo disperso con 9 g SSV/L fue el más alto, alcanzando 231.6 mL, pero es estadísticamente similar al obtenido con 6 g SSV/L que alcanzó 212.3 mL. En tanto, con el lodo disperso a 3 g SSV/L no hubo diferencia significativa al compararlo con las tres concentraciones de lodo granular. Con la FS, el valor de M_{max} más alto también

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Gompertz tras la digestión anaerobia de los distintos tipos de agua residual, utilizando tres concentraciones de lodo disperso (LD) y lodo granular (LG).

Table 2. Kinetic parameters obtained from the Gompertz model after the anaerobic digestion of the different types of wastewaters, using three concentrations of disperse (LD) and granular sludge (LG).

| Tipo de lodo y concentración (g SSV/L) | Fase lag, (días) | M_{max} (mL) | R_{max} (mL/día) | R^2 | Decremento en M_{max}^a |
|--|------------------|-----------------|--------------------|--------|---------------------------|
| Efluente crudo | | | | | |
| LD (3) | 1.55 + 0.16 a | 191.7 + 11.2 ab | 15.1 + 3.9 ab | 0.9953 | -2.14 |
| LD (6) | 0.92 + 0.19 b | 212.7 + 6.7 ac | 19.5 + 1.1 ac | 0.9958 | -2.17 |
| LD (9) | 0.81 + 0.03 b | 231.6 + 17.4 c | 23.6 + 1.7 c | 0.9962 | -2.14 |
| LG (3) | 0.76 + 0.14 b | 189.9 + 12.8 ab | 10.7 + 2.8 b | 0.9956 | -2.18 |
| LG (6) | 0.69 + 0.14 b | 180.0 + 2.0 b | 13.0 + 0.4 b | 0.9961 | -2.28 |
| LG (9) | 1.05 + 0.02 b | 182.9 + 4.0 b | 13.0 + 0.4 b | 0.9935 | -2.17 |
| Fracción sólida | | | | | |
| LD (3) | 2.43 + 0.75 a | 250.3 + 10.4 a | 18.8 + 1.6 a | 0.9957 | -- |
| LD (6) | 1.49 + 0.33 ab | 285.7 + 13.4 b | 21.4 + 2.9 ab | 0.9961 | -- |
| LD (9) | 1.06 + 0.16 bc | 318.8 + 15.5 c | 24.5 + 1.2 b | 0.9977 | -- |
| LG (3) | 0.38 + 0.13 c | 258.1 + 10.4 ab | 11.8 + 1.8 c | 0.9962 | -- |
| LG (6) | 0.53 + 0.15 bc | 251.2 + 7.3 a | 12.1 + 0.4 c | 0.9953 | -- |
| LG (9) | 0.50 + 0.09 c | 253.6 + 7.7 a | 13.6 + 0.1 c | 0.9957 | -- |
| Fracción líquida | | | | | |
| LD (3) | 0.81 + 0.43 a | 160.8 + 13.1 a | 15.1 + 0.9 a | 0.9949 | -- |
| LD (6) | 0.30 + 0.11 ab | 171.7 + 7.3 a | 19.0 + 1.4 b | 0.9889 | -- |
| LD (9) | 0.03 + 0.02 b | 173.5 + 2.4 a | 20.5 + 0.7 b | 0.9848 | -- |
| LG (3) | 0.35 + 0.04 ab | 133.8 + 3.8 b | 12.2 + 1.2 c | 0.9966 | -- |
| LG (6) | 0.29 + 0.12 ab | 127.2 + 2.4 b | 15.1 + 0.2 a | 0.9942 | -- |
| LG (9) | 0.61 + 0.11 a | 130.3 + 0.5 b | 14.8 + 0.9 ac | 0.9899 | -- |

^a Número de veces en que la producción de metano en el efluente crudo disminuye respecto a la suma del metano producido por separado en la fracción sólida y fracción líquida, según tipo y concentración de lodo.

Los valores representan el promedio \pm desviación estándar.

Letras diferentes después de cada valor indican diferencia significativa en las medias ($P < 0.05$), según el tipo de agua residual utilizada.

se obtuvo con el lodo disperso a una concentración de 9 g SSV/L, que estadísticamente es diferente a los valores obtenidos con los otros tratamientos de la FS. Para la FL, M_{\max} es estadísticamente similar para las tres concentraciones de lodo disperso, pero mostraron diferencia respecto a las tres concentraciones del lodo granular (Tabla 2). La estrategia de separación y posterior digestión de la FS y FL permitió incrementar la cantidad total de metano acumulado en comparación a la digestión del EC. Es decir, en todos los casos la suma de M_{\max} de las FS y FL es mayor a la cantidad de metano producido por el EC, si se comparan los resultados entre las mismas concentraciones, evidenciado por una producción entre 2.14 y 2.28 veces menor con el EC (Tabla 2).

De manera similar a la M_{\max} , la R_{\max} presenta valores más altos tanto con el uso de lodo disperso y la FS (Tabla 2). Para ejemplo, los valores de R_{\max} alcanzados con la FS inoculados con el lodo disperso se incrementaron 1.59, 1.76 y 1.80 veces en comparación con los cultivos con el lodo granular para las concentraciones de 3, 6 y 9 g SSV/L, respectivamente, encontrando diferencia significativa entre ambos tipos de lodo. Los cultivos con el lodo disperso con 6 y 9 g SSV/L, bajo los tres tipos de agua residual, alcanzaron los valores de R_{\max} más altos y mostraron diferencia significativa con el resto de los tratamientos. La tasa específica de producción de metano resultó mayor al utilizar el lodo disperso en comparación con el lodo granular para los tres tipos de muestras de agua residual. Además, se encontró que entre menor fue la concentración de inóculo utilizada, las tasas específicas fueron más altas (Figura 3). Por ejemplo, para la FS y lodo disperso a 3 g SSV/L, la tasa específica alcanzó 6.25 mL $\text{CH}_4/\text{g SSV-día}$, en contraste, con 9 g SSV/L fue tan sólo de 2.72 mL CH_4/g

SSV-día, valores que presentan diferencia estadística significativa. Para el lodo granular sucedió algo proporcionalmente similar, en donde a la concentración de inóculo más baja se alcanzaron 3.94 mL $\text{CH}_4/\text{g SSV-día}$, en tanto para 9 g SSV/L fue 1.51 mL $\text{CH}_4/\text{g SSV-día}$, que son estadísticamente diferentes. Al comparar las tasas específicas entre ambos lodos para los cultivos con la FS, hay una diferencia importante (hasta 80 %), y en todos los casos para este tipo de agua residual, la diferencia estadística es significativa. Sin embargo, para la FL la diferencia fue menor (hasta 38 %), encontrándose que no hay diferencia significativa, excepto para la FL inoculado con 3 g SSV/L.

Tratamiento de los efluentes porcinos

El tratamiento de los efluentes generados en granjas porcinas no debe considerarse de manera trivial. En parte, la complejidad de este tipo de efluentes radica en su alto contenido de materia orgánica, en donde una fracción elevada se encuentra como material particulado, con presencia de componentes que pueden resultar tóxicos como el amonio y antibióticos. A pesar de estas condiciones limitantes, hay disponibles una cantidad importante de biotecnologías que pueden ser utilizadas para obtener energía y diferentes productos químicos de alto valor a partir de los residuos de granjas porcinas (Alvarez *et al.*, 2019). Resulta relevante el hecho de que un número importante de granjas porcinas en México carece de sistemas de tratamiento de sus residuos líquidos y sólidos o bien operan de forma ineficiente, teniendo principalmente sistemas a base de lagunas de oxidación, pero que no cumplen los estándares mínimos de calidad y eficiencia (Cervantes *et al.*, 2007; Garzón-Zúñiga y Buelna, 2014). De

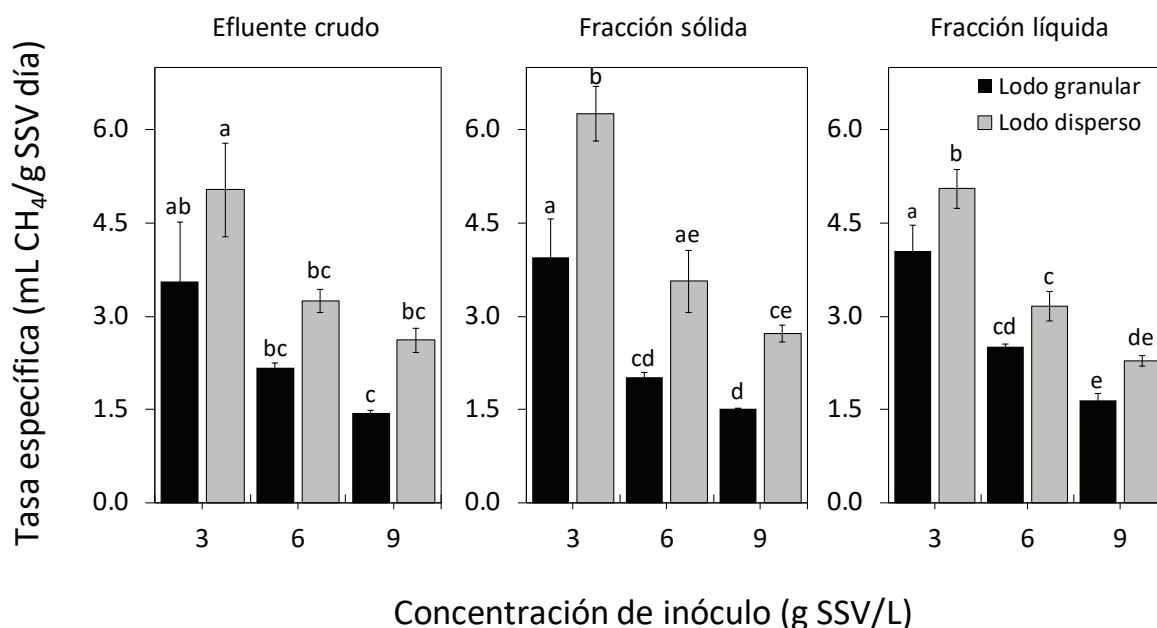


Figura 3. Tasa específica de producción de metano a partir de los cultivos con las diferentes muestras de agua residual porcina y concentraciones de inóculo. Letras diferentes arriba de cada barra indican diferencia significativa en las medias ($P < 0.05$), según el tipo de agua residual utilizada.

Figure 3. Specific methane production rate from the cultures with the different samples of swine wastewater and inoculum concentrations. Different letters on each bar indicates significant difference in means ($P < 0.05$), according to the type of wastewater used.

acuerdo a los resultados plasmados en este y otros estudios similares, la estrategia de separación de las fracciones sólidas y líquidas de los efluentes porcinos puede permitir mejorar la productividad de metano, la eficiencia de degradación de la materia orgánica, o bien la obtención de productos de alto valor como los mencionados por Alvarez *et al.* (2019).

En este estudio se utilizó lodo granular y lodo disperso, sin embargo, el principal propósito no fue identificar cuál éstos dos tipos de inóculos presenta una mayor capacidad de degradación. En tanto, el objetivo fue evaluar el impacto de separar las diferentes fracciones del agua residual porcina durante la digestión anaerobia utilizando diferentes inóculos. El lodo granular y lodo disperso representan el tipo de inóculo utilizado en los reactores UASB y CSTR, respectivamente, que son dos de los sistemas de digestión anaerobia más representativos. La Figura 4 presenta dos propuestas de tratamiento de los residuos generados en granjas porcinas. En uno de los casos se plantea el uso de un sedimentador primario para la separación inicial de las fracciones del agua residual y su posterior tratamiento mediante procesos anaerobios en un reactor tipo UASB para la fracción líquida y un reactor CSTR para la fracción sólida (Figura 4A). En la Figura 4B se plantea un tratamiento sin la separación de las fracciones, iniciando con la digestión anaerobia del efluente

crudo en un reactor CSTR y posteriormente en un reactor UASB. En ambos casos de la Figura 4, el efluente del reactor UASB, conocido como digestato, puede utilizarse para riego agrícola debido a su contenido de nitrógeno y fósforo (Baştabak y Koçar, 2020). Además, el biogás generado en los reactores CSTR y UASB a partir de la digestión de las fracciones, puede ser utilizado para la generación de calor o electricidad (Kaparaju y Rintala, 2013), para el consumo en la granja o bien para proveer a pequeñas comunidades en función de la cantidad generada. Por último, los sólidos que se generen al final del proceso de tratamiento pueden ser utilizados para la producción de composta (Wang *et al.*, 2018). Las propuestas de la Figura 4 son dos ejemplos de configuración de sistemas de tratamiento de los efluentes porcinos, pueden tenerse diferentes posibilidades dadas las necesidades, objetivos y recursos disponibles.

Los procesos centrales indicados en la Figura 4 son el uso de los reactores CSTR y UASB, en donde se pueden llevar a cabo todas las etapas de la digestión anaerobia, pero cuando se utilizan en un sistema de dos etapas consecutivas (CSTR-UASB), normalmente su función se especializa para los procesos de hidrólisis/acidogénesis y de metanogénesis, respectivamente (Van *et al.*, 2020). El uso de los reactores para estos procesos de digestión anaerobia está en función

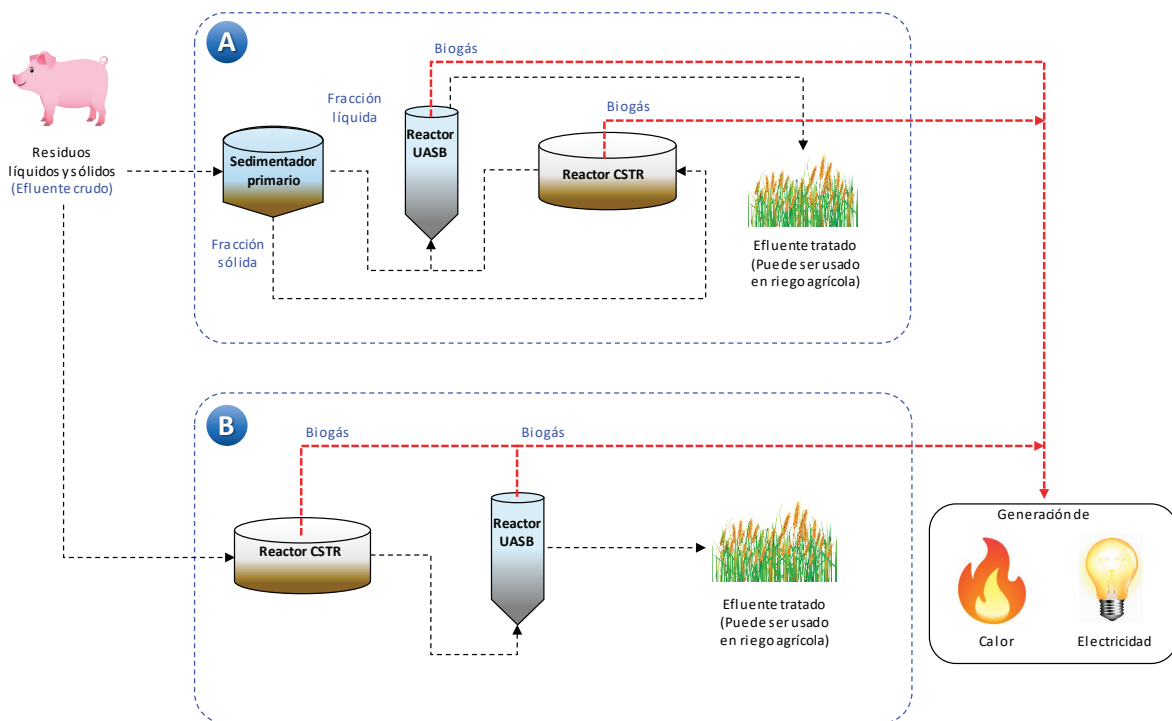


Figura 4. Estrategias biotecnológicas para tratar residuos sólidos y líquidos generados en granjas porcinas. Caso A: Pre-tratamiento inicial con un sedimentador primario para separar las fracciones sólidas y líquidas presentes en el efluente crudo. La fracción líquida es tratada en un reactor UASB y la fracción sólida en un reactor CSTR. El efluente del reactor CSTR se conduce al reactor UASB. Caso B: Tratamiento inicial del efluente crudo proveniente de la granja en un reactor CSTR, seguido de un reactor UASB que recibe la fracción líquida generada en el reactor CSTR. En ambos casos el efluente final puede ser aplicado en riego agrícola.

Figure 4. Biotechnological strategies to treat solid and liquid wastes produced in swine farms. Case A: Initial pre-treatment with a primary sedimentation tank to separate the solid and liquid fraction of the raw effluent. The liquid fraction is treated in a UASB reactor and the solid fraction in a CSTR reactor. The CSTR reactor effluent is conducted to the UASB reactor. Case B: Initial treatment of the raw effluent from the farm in a CSTR reactor, followed of an UASB reactor that receive the effluent from the CSTR reactor. In both cases, the final effluent can be used for agriculture irrigation.

a las fracciones sólida/líquida a tratar, en tanto que en los reactores CSTR el sustrato puede contener más de 10% de sólidos, donde es requerida la etapa hidrolítica (Van *et al.*, 2020), tal como los efluentes porcinos; los reactores UASB operan con sustratos con sólidos a una concentración $\leq 3\%$, para favorecer la metanogénesis (Abbasi *et al.*, 2011). Las propuestas de la Figura 4 consideran la digestión anaerobia inicial en dos etapas: un reactor CSTR (hidrólisis) seguido de un reactor UASB (metanogénesis), que permite optimizar las etapas de la digestión anaerobia a través del crecimiento de microorganismos especializados en sus ambientes óptimos y es más robusto que un sistema de una etapa al permitir fluctuaciones en la concentración de residuos (Van *et al.*, 2020).

Aun cuando el reactor CSTR permite la digestión de la FS, una de sus desventajas es la necesidad de volúmenes grandes de reactor para alcanzar una cantidad de biomasa suficiente o bien largos tiempos de residencia hidráulica para degradar la materia orgánica (Van Lier *et al.*, 2015). Además, el lodo disperso utilizado en los reactores CSTR puede lavarse con facilidad según las condiciones de mezclado, en tanto el lodo granular permanece intacto en el reactor UASB (Hulshoff Pol, 1989), que los ubica como reactores de alta densidad celular. Las ventajas de tener bacterias agregadas en forma de gránulos son: 1) permite que las poblaciones heterogéneas de microorganismos sintróficos se mantengan en condiciones fisiológicas favorables; 2) promueve fenómenos simbióticos; 3) incrementa la capacidad del consumo de nutrientes; 4) protege a las bacterias de organismos predadores; 5) disminución de la distancia de difusión para los intermediarios de la fermentación; y 6) protección de las células cuando existen condiciones poco favorables para el crecimiento (i.e. pH extremo) (Fitzpatrick *et al.*, 1989). También, la construcción de reactores UASB requieren de un espacio menor de terreno, toleran altas cargas orgánicas y requieren menos tiempo de tratamiento (van Lier *et al.*, 2015). Las ventajas que ofrecen los reactores CSTR y UASB permiten complementarse apropiadamente y los hacen sistemas de tratamiento apropiados para tratar efluentes porcinos.

CONCLUSIONES

La separación de sólida-líquida del agua residual porcina representa una estrategia para incrementar la eliminación de materia orgánica del agua. En este estudio, la separación de sólidos contribuyó en la eliminación de 69 % de la DQO inicial. En el proceso de digestión anaerobia, la eficiencia de eliminación de DQO estuvo entre 47.5 % y 89 %, en función de las condiciones experimentales probadas. La mayor cantidad de metano acumulado se produjo utilizando la FS, evidenciado por el incremento en M_{max} entre 1.31 y 1.39 veces utilizando el lodo disperso y lodo granular, respectivamente, con relación a lo producido por el EC. Además, la cantidad total de metano que se produjo en conjunto por las FS y FL es mayor a la cantidad metano acumulado en el EC, lo cual evidencia que la separación sólida-líquida no sólo permite eliminar DQO del agua, sino que también mejora el proceso de digestión anaerobia. Los resultados de este

estudio demuestran que es posible mejorar los sistemas de tratamiento de aguas residuales generadas en granjas porcinas aplicando tecnologías de fácil operación como los sedimentadores primarios. También, la aplicación de procesos anaerobios para sólidos, como los reactores CSTR, así como para los residuos líquidos en reactores tipo UASB, permitirá recuperar de manera más eficiente la energía a partir de la transformación de la materia orgánica en metano.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Sonora por el respaldo financiero otorgado para la realización de este estudio mediante el Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI-2021).

REFERENCIAS

- Abbasi, T., Tauseef, S., Abbasi, S. 2011. Biogas energy. In: Springer Briefs in Environmental Science. Springer Science and Business Media, New York.
- Alvarez, L.H., García-Reyes, R.B., Ulloa-Mercado, R.G., Arellano Gil, M., García-González, A. 2019. Potencial biotecnológico para la valorización de residuos generados en granjas porcinas y cultivos de trigo. *Entreciencias* 7, 1-21.
- APHA. 2005. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.
- Barker, J.C., Zublena, J.P. 1996. Livestock manure nutrient assessment in North Carolina. North Carolina.
- Baştabak, B., Koçar, G. 2020. A review of the biogas digestate in agricultural framework. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* <https://doi.org/10.1007/s10163-020-01056-9>
- Boursier, H., Béline, F., Paul, E. 2005. Piggery wastewater characterisation for biological nitrogen removal process design. *Bioresour. Technol.* 96, 351-358. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2004.03.007>
- Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sørensen, B., Tolls, J. 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.* 37, 286A-294A.
- Cervantes, F.J., Saldívar, J., Yescas, J.F. 2007. Estrategias para el aprovechamiento de desechos porcinos en la agricultura. *Rev. Latinoam. Recur. Nat.* 3, 3-12.
- Cestonaro do Amaral, A., Kunz, A., Radis Steinmetz, R.L., Scussiato, L.A., Tápparo, D.C., Gaspareto, T.C. 2016. Influence of solid-liquid separation strategy on biogas yield from a stratified swine production system. *J. Environ. Manage.* 168, 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.12.014>
- Cioabla, A.E., Ionel, I., Dumitrel, G.A., Popescu, F. 2012. Comparative study on factors affecting anaerobic digestion of agricultural vegetal residues. *Biotechnol. Biofuels* 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-39>
- Dourmad, J.Y., Ryschawy, J., Trousson, T., Bonneau, M., González, J., Houwers, H.W.J., Hviid, M., Zimmer, C., Nguyen, T.L.T., Morgensen, L. 2014. Evaluating environmental impacts of contrasting pig farming systems with life cycle assessment. *Animal* 8, 2027-2037. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002134>
- FIRA, 2020. Panorama Agroalimentario: Carne de Cerdo.
- Fitzpatrick, J.A., Roam, G.D., You, B.T. 1989. Anaerobic microbial aggregation and model development of a UASBR, in: Symposium on Anaerobic Digestion. Taipei, Taiwan, pp. 15-18.

- Garzón-Zúñiga, M.A., Buelna, G. 2014. Caracterización de aguas residuales porcinas y su tratamiento por diferentes procesos en México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 30, 65-79.
- Hanselman, T.A., Graetz, D.A., Wilkie, A.C. 2003. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5471-5478.
- Hulshoff Pol, L. 1989. The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. Wageningen University, Wageningen.
- Kaparaju, P., Rintala, J. 2013. Generation of heat and power from biogas for stationary applications: Boilers, gas engines and turbines, combined heat and power (CHP) plants and fuel cells, in: *The Biogas Handbook: Science, Production and Applications*. Elsevier Inc., pp. 404-427. <https://doi.org/10.1533/9780857097415.3.404>
- Kebede-Westhead, E., Pizarro, C., Mulbry, W.W. 2006. Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: Production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates. *J. Appl. Phycol.* 18, 41-46. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9012-8>
- Rico, C., Rico, J.L., García, H., García, P.A. 2012. Solid - Liquid separation of dairy manure: Distribution of components and methane production. *Biomass and Bioenergy* 39, 370-377. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.031>
- Tomei, M.C., Braguglia, C.M., Cento, G., Mininni, G. 2009. Modeling of Anaerobic Digestion of Sludge. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39, 1003-1051. <https://doi.org/10.1080/10643380801977818>
- Van, D.P., Fujiwara, T., Tho, B.L., Toan, P.P.S., Minh, G.H. 2020. A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste: Configurations, operating parameters, and current trends. *Environ. Eng. Res.* 25, 1-17. <https://doi.org/10.4491/EER.2018.334>
- Van Epps, A., Blaney, L. 2016. Antibiotic Residues in Animal Waste: Occurrence and Degradation in Conventional Agricultural Waste Management Practices. *Curr. Pollut. Reports.* <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0037-1>
- Van Lier, J.B., van der Zee, F.P., Frijters, C.T.M.J., Ersahin, M.E. 2015. Celebrating 40 years anaerobic sludge bed reactors for industrial wastewater treatment. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9375-5>
- Vanotti, M.B., Ro, K.S., Szogi, A.A., Loughrin, J.H., Millner, P.D. 2018. High-Rate Solid-Liquid Separation Coupled With Nitrogen and Phosphorus Treatment of Swine Manure: Effect on Water Quality. *Front. Sustain. Food Syst.* 2, 49. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00049>
- Wang, K., Mao, H., Wang, Z., Tian, Y. 2018. Succession of organics metabolic function of bacterial community in swine manure composting. *J. Hazard. Mater.* 360, 471-480. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.032>
- Yang, D., Deng, L., Zheng, D., Liu, G., Yang, H., Wang, L. 2015. Separation of swine wastewater into solid fraction, concentrated slurry and dilute liquid and its influence on biogas production. *Fuel* 144, 237-243. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2014.12.044>

Uso de gel de *Aloe vera* en la producción de plántulas de *Capsicum chinense*

Use of *Aloe vera* gel in *Capsicum chinense* seedlings production

Tucuch-Haas CJ¹, Cen-Caamal JC¹, Kancab-Uc RA², Tucuch-Haas JI^{3*}

¹ Tecnológico Nacional de México/ITS del Sur del Estado de Yucatán, Carretera Muna-Felipe Carrillo Puerto Tramo Oxcutzcab-Akil, Km 41+400, Oxcutzcab, Yucatán, México.

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera la Victoria Km. 06 Hermosillo, Sonora, México.

³ Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria. Campo Experimental Mococho, Km 25 Carretera Mérida-Motul, Yucatán, México.

RESUMEN

La producción de chile habanero en Yucatán, demanda plántulas de calidad al momento del trasplante, lo que ha llevado al uso de reguladores de crecimiento, que si bien es cierto potencializan la germinación y desarrollo de las plantas, también incrementan los costos de producción. Por tal motivo se están buscando alternativas de producción que reduzcan los costos, razón por la cual, se ha puesto la mirada en el gel de la sábila, cuya composición química reporta la presencia de fitorreguladores como las giberelinas y el ácido salicílico. Para estudiar la respuesta del gel de sábila en la emergencia y desarrollo de la raíz y vástago en plántulas de chile habanero, se sembraron 500 semillas de chile habanero variedad "Mayapan", en grupos de 100, previamente embebidas en 100 mL de gel de sábila al 0, 2.5, 5, 10 y 20 %, durante 24 h. Los resultados obtenidos demuestran que el gel de sábila reduce cuatro días la emergencia y favorece hasta en un 18 % el desarrollo radicular, la altura de la planta y biomasa fresca total; 11 % el diámetro del tallo y 13 % número de hojas, observándose un mayor efecto con la solución al 5 % de gel de sábila.

Palabras clave: Fitorregulador, sábila, chile habanero, imbibición.

ABSTRACT

The production of habanero pepper in Yucatán demands quality seedlings at the time of transplantation, which has led to the use of growth regulators, which, although it is true, potentiate the germination and development of the plants, they also increase production costs. For this reason, production alternatives are being sought that reduce costs, which is why an eye has been focused on *Aloe vera* gel, whose chemical composition reports the presence of phytohormones such as gibberellins and salicylic acid. To study the response induced by the aloe gel in the emergence and development of the root and shoot in habanero pepper seedlings, 500 seeds of the habanero pepper variety "Mayapan" were sown, in groups of 100, previously soaked in 100 mL of aloe gel at 0, 2.5, 5, 10 and 20 %, for 24 h. The results obtained show that *Aloe vera* gel reduces emergence by four days and favors root development, plant height and total fresh biomass by up to 18 %, also 11 % the diameter of the stem and 13% number

of leaves, observing a greater effect with the 5 % solution of *Aloe vera* gel.

Keywords: Phytohormone, *Aloe vera*, habanero pepper, imbibition.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial México ocupa el segundo lugar en la producción de frutos de género *Capsicum*, con un volumen promedio de los últimos diez años de 2,785,000 toneladas anuales (SIAP, 2020). En particular para la especie *C. chinense* (chile habanero) cuya principal región de producción es el sur del país, en la que destaca el estado de Yucatán como el primer lugar de producción, se reporta un promedio de producción de 9, 529.8 toneladas (SIACOM, 2020) que va en aumento.

C. chinense posee gran diversidad de usos en la industria química, alimentaria y farmacéutica gracias a sus bondades nutricionales y terapéuticas dado su nivel de pungencia (Flores-López y Sánchez-Osorio, 2020), aunado a su denominación de origen otorgado en el 2010 por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial IMPI (DOF, 2010), han sido los detonantes claves en los incrementos en la demanda de esta hortaliza, lo que ha llevado a expertos en el área a la búsqueda de alternativas, que garanticen el buen desarrollo de las plantas e incrementen el rendimiento del fruto.

Una práctica común en la actualidad, dentro del sistema producción de chile habanero, es el empleo de almácigos en charolas de poliestireno (González *et al.*, 2018) con la cual se busca un alto porcentaje de germinación de las semillas y buen vigor de las plántulas al momento del trasplante (Castillo-Aguilar *et al.*, 2015), mediante el control de condiciones de luz, humedad, aporte de nutrientes y problemas fitosanitarios (Preciado *et al.*, 2002; Mendoza-Paredes *et al.*, 2021). Entre otras prácticas, además del uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Adame-García *et al.*, 2021), que se emplea de manera adicional, como herramienta para garantizar la germinación, mayor vigor y capacidad de resistir el estrés del trasplante, se encuentra el uso de fitorreguladores o reguladores de crecimiento vegetal. Al respecto Castro *et al.* (2019) mencionan que la adecuada selección y aplicación de los fitorreguladores durante el cultivo de plantas de interés agrícola, representa una importante herramienta

*Autor para correspondencia: Jorge Ismael Tucuch Haas
 Correo electrónico: leamsi182@hotmail.com

Recibido: 28 de julio de 2021
Aceptado: 7 de enero de 2022

para mejorar algunos de los aspectos de mayor interés en su producción.

Si bien existen diversos productos a base de fitorreguladores sintéticos en el mercado, disponibles para su uso (Ramírez-Luna *et al.*, 2005), estos son pocos disponibles en las comunidades más apartadas de las ciudades, además eleva los costos de producción e impacta directamente al bolsillo del productor. Sin embargo, algunos órganos de especies vegetales, dado su alta concentración de fitorreguladores presentan un potencial uso como estimulante en el desarrollo de otras especies vegetales (Carranza *et al.*, 2021), tal es el caso de *Aloe vera*. De acuerdo con Domínguez-Fernández (2012) el gel de *Aloe vera* dentro de su composición química posee fitorreguladores, tales como las giberelinas y ácido salicílico, esta primera responsable de la ruptura de la dormancia o latencia de las semillas principalmente (Li *et al.*, 2015) y este último de la protección contra patógenos (Lu *et al.*, 2016), entre otras funciones como el favorecimiento en el desarrollo de plántulas (Tucuch *et al.*, 2016).

Evidencias de la acción del gel de *Aloe vera* como regulador de crecimiento vegetal han sido reportado por Boschi *et al.* (2017) al evaluar su aplicación a estaquillas de *Origanum vulgare* para propagación, donde observaron mayor número de raicillas y longitud de estas. Por otro lado, su uso en medios de cultivos para la propagación *in vitro* ha demostrado mejor respuesta en la formación de raíces, incluso superó a los reguladores de crecimiento tradicionales tales como AIA y AIB (Pulido y Becerra, 2016).

Dado las necesidades de producción de plántulas de calidad y las evidencias planteadas del gel de *Aloe vera*, respecto a su función como regulador de crecimiento vegetal y puesto que no existe reportes de su aplicación en el cultivo de chile habanero, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la respuesta de este compuesto en la germinación y desarrollo de plántulas de chile habanero en semilleros.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán (ITSSY), en un invernadero tipo túnel de 500 m². Como material vegetal se utilizaron semillas de chile habanero variedad Mayapan.

Las pencas de sábila, para la extracción del gel se colectaron en el "Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán", específicamente en áreas prácticas de dicho instituto, para la cual se tomaron en cuenta aspectos como la altura, el diámetro (grosor de la penca) y sobre todo el estado de madurez. Se cortaron las hojas inferiores, cercanas a la base de la planta. Una vez obtenidas las pencas de sábila se procedió a su desinfección, al igual que los materiales (probeta de 1 L y 100 mL, vaso de precipitado 1 L, agitador, cuchillo), con una solución de cloro al 2 %.

Para la preparación de los tratamientos (2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 % de gel se sábila), se procedió a extraer el gel de las pencas (Figura 1), mediante el método del fileteado con la finalidad de extraer en su totalidad el gel. Para la obtención



Figura 1. Pencas de *Aloe vera* seleccionada (A) y gel extraído (B) para la elaboración de los tratamientos.

Figure 1. *Aloe vera* stalks selected for the extraction of the gel (A) and the extracted gel (B) for the elaboration of the treatments.

de los tratamientos se pesaron 25, 50, 100 y 200 g de gel de sábila, con la ayuda de una balanza analítica, mismas que se licuaron en 500 mL de agua y retiraron las impurezas con un tamiz de 1mm de diámetro, finalmente se aforaron a 1 L con agua y colocaron en envases de plásticos con capacidad de 1 L.

Previo al suministro de los tratamientos a las semillas se les realizó una desinfección, para tal efecto se sumergieron las semillas en 100 mL de una solución de cloro al 1%, durante cinco minutos, para posteriormente hacerle dos enjuagues con 50 mL de agua destilada.

Terminada la desinfección y separadas en grupos de 100 semillas, se embebieron en 100 mL de sus respectivos tratamientos [2.5, 5.0, 10, 20 % de GS y un control (0.0%)] durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la siembra, en charolas de unicele de 200 cavidades, previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito al 2 %. Como sustrato se utilizó 10 Kg de Peat Moss y 4 L de agua para humedecer.

Posterior a la germinación, se aplicaron riegos de a 5 mL por cavidad cada tercer día, con la ayuda de una jeringa, para obtener un riego uniforme y se rotaron las charolas todos los días para asegurar que todas las plántulas recibieran la misma cantidad de luz solar, cabe mencionar que las rotaciones se realizaron dos veces al día. Una vez acomodadas las charolas dentro del invernadero y que las plántulas presentaron las primeras hojas verdaderas bien definidas, se inició con la fertilización (10 días después de la emergencia) para posteriormente continuar cada tercer día, con la ayuda de una jeringa (5 mL planta⁻¹), con un suministro de 0.22 g L⁻¹ de urea, 0.33 g L⁻¹ de MAP y 0.40 g L⁻¹ de NKS y 1 mL de poliquel multi® en 10 L de agua.

Independiente a la imbibición de las semillas a los 14 y 21 días después de la siembra se aplicaron los mismos tratamientos, de manera foliar, con la ayuda de un atomizador, hasta punto de goteo (300 mL por tratamiento).

La emergencia de las plántulas se evaluó a partir de los 4 días y hasta los 15 días después de la siembra, para ello, se cuantificó diariamente el número de cavidades con cotiledones expuestas en la superficie del sustrato. La altura

de la planta, el diámetro del tallo y la longitud de la raíz se evaluaron a los 31 días después de la siembra, para la altura se utilizó una regla milimétrica; los puntos de referencia para hacer la medición fueron la base del tallo y la yema apical de la planta; el diámetro del tallo se realizó a 5 cm de la base proximal al sustrato mediante un vernier digital; mientras que la longitud de la raíz se determinó de la base del tallo hasta el ápice de la raíz principal.

Entre otras variables se evaluó el peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz: Para obtener el peso fresco, se sacaron las plántulas tomadas al azar de cada tratamiento de las charolas (15 plantas por tratamiento) y mismas a las que se le lavaron la raíz, hasta dejarlo libre de sustrato; posteriormente se dividió la planta en hojas, tallo y raíz, y por último con una balanza analítica se cuantificó los pesos de cada órganos y biomasa fresca total. Una vez tomado los datos del peso fresco, las muestras se metieron en bolsas de papel para poder secarlas en una estufa a una temperatura de 60 °C, cuando alcanzaron un peso constante (72 h), con la balanza analítica se cuantificó el peso seco de la hoja, tallo y raíz de todas las muestras.

Se empleó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos más un control, con 15 repeticiones y una planta como unidad experimental. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza y cuando se detectaron diferencias estadísticas se realizó la comparación de medias por el método Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Emergencia

La respuesta presentada por acción del GS en la emergencia de plántulas de chile habanero se reporta en la Figura 2, el cual permite señalar que las semillas de chile habanero respondieron de manera significativa a los tratamientos de GS. El inicio de la emergencia de todos los tratamientos, con excepción de la concentración 10 % de GS, que ocurrió un día después, se manifestaron a los 6 dds, mientras que la del control ocurrió a los 11 dds. El vigor de las semillas considerado como el tiempo necesario para que emerjan el 50 % de las plántulas, se vio favorecida con todos los tratamientos, dado que este valor se alcanzó cuatro días previos al del control; de igual forma la viabilidad, determinada como el porcentaje de semillas que son capaces de germinar, aumentó con los tratamientos, observándose un mayor efecto con la concentración 5 % de GS, que obtuvo el 97 % de germinación frente al control que fue de 80 %.

La respuesta favorable del GS a la emergencia, puede ser atribuido a la presencia de giberelinas en su composición química (Domínguez-Fernández *et al.*, 2012), los cuales son responsables de dar inicio a la germinación (Alcantara *et al.*, 2019), al respecto Pérez y Pita (1998) mencionan que las giberelinas son capaces de promover la germinación de semillas tanto durmientes como no durmientes. Entre otros compuestos se encuentran algunas enzimas importantes como las lipasas y amilasas, responsables de la degradación

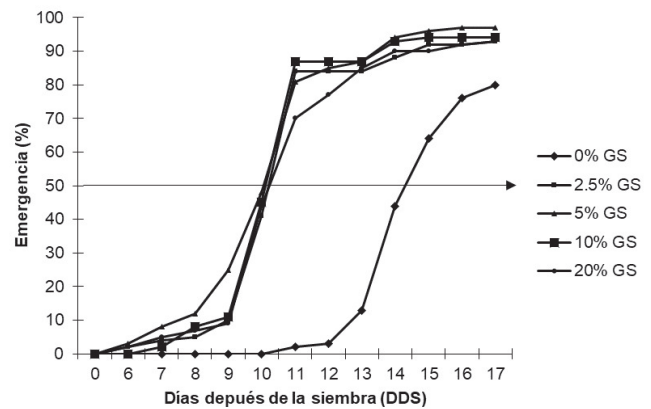


Figura 2. Patrón de respuesta en la dinámica de emergencia por efecto de diferentes porcentajes del gel de sábila (GS).

Figure 2. Response pattern in the emergence dynamics of habanero pepper seedlings due to the effect of different concentrations of *Aloe vera* gel (GS).

de lípidos y almidón respectivamente, almacenadas como reserva, para la obtención de la energía necesaria para la activación del metabolismo de la semilla; además de la glucosa y aminoácidos, que también participan en el suministro de energía necesaria para el metabolismo de las semillas (Pérez y Pita, 1998; Domínguez-Fernández *et al.*, 2012).

Altura de planta, diámetro del tallo y longitud de la raíz

Tanto la altura del vástago, como el diámetro del tallo y la longitud de la raíz incrementaron significativamente en un 18.3, 12.5 y 14.2 % respectivamente comparado con el control, por el efecto del GS al 5 % (Figura 3), mientras que, para el resto de los tratamientos, aunque superaron al control no fueron estadísticamente significativos. Este comportamiento sugiere que 50 g del gel diluidas en un litro de agua, son suficientes para inducir un efecto significativo en el desarrollo de las plantas y da la pauta para sugerir, que el efecto presentado, es por acción de los fitorreguladores presentes, como se sabe, por lo general estos ejercen su función a muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, donde cambian los patrones de crecimiento de los vegetales y permiten su control (Alcantara *et al.*, 2019).

Respecto al diámetro del tallo (Figura 3) se puede apreciar que al igual que para la altura, el tratamiento 5 % de GS fue el que mejor resultado presentó, el cual superó al control y al tratamiento 20 % de GS, no así para 2.5 % y 10 % de GS, los cuales fueron estadísticamente iguales, aunque sus valores se encontraron ligeramente por debajo de esta.

Por otro lado (Figura 3), se pudo determinar que diferente al comportamiento de los valores de altura de planta y diámetro del tallo, en la cual el suministro de 5 % de GS presentaron los mejores resultados, en la longitud de la raíz, la mayor sensibilidad se presentó cuando se utilizó GS con una dosis de 2.5 %, sin embargo, no fueron estadísticamente diferentes a la concentración del 5 %, pero sí con el resto de los tratamientos y el control. Este comportamiento sugiere que la raíz presenta una sensibilidad más marcada a bajas concentraciones, por lo que los niveles y sensibilidad de los

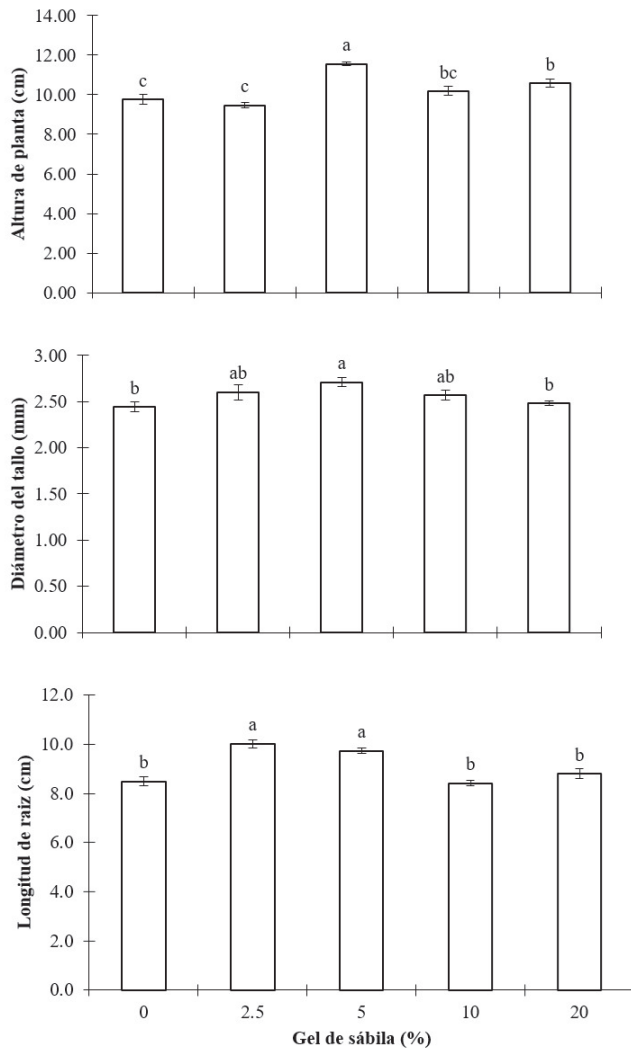


Figura 3. Patrones de respuesta en la altura de la planta, diámetro del tallo y longitud de la raíz al efecto de diferentes concentraciones de gel de sábila en plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense*), cada punto es la media de 15 repeticiones \pm error estándar. Valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Figure 3. Response patterns in plant height, stem diameter and root length, to the effect of different concentrations of *Aloe vera* gel in habanero pepper (*Capsicum chinense*) seedlings, each point is the mean of 15 repetitions \pm error standard. Values with the same letter within columns are equal according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

tejidos juegan un papel importante en la expresión de la respuesta.

Biomasa fresca y seca

En la Tabla 1 se reporta el efecto de GS en el número de hojas, biomasa seca y fresca total. El número de hojas presentó diferencias significativas para todos los tratamientos respecto al control, no así entre tratamientos; la máxima diferencia encontrada fue 12 % con el tratamiento de 5 % de GS. Respecto a la biomasa fresca total solo el tratamiento con 2.5 % de GS presentó diferencia significativa, incrementándose en un 18 % por encima del control; mientras que para la biomasa seca total los tratamientos 5 y 10 % de GS,

Tabla 1. Efecto de diferentes porcentajes de gel de sábila en la biomasa de plántulas de chile habanero.

Table 1. Effect of different percentages of *Aloe vera* gel on the biomass of habanero pepper seedlings.

| Trat (% GS) | NH (#) | BFT (g) | BST (g) |
|-------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 0 | 6.6 \pm 0.16 b | 1.22 \pm 0.025 b | 0.126 \pm 0.002 b |
| 2.5 | 7.4 \pm 0.17 a | 1.45 \pm 0.073 a | 0.101 \pm 0.008 ab |
| 5 | 7.5 \pm 0.16 a | 1.40 \pm 0.042 ab | 0.159 \pm 0.004 a |
| 10 | 7.4 \pm 0.16 a | 1.37 \pm 0.047 ab | 0.138 \pm 0.007 a |
| 20 | 7.4 \pm 0.16 a | 1.37 \pm 0.031 ab | 0.126 \pm 0.005 ab |

GS= gel de sábila; NH=número de hoja; BFT=biomasa fresca total; BST=biomasa seca total. Cada valor es la media de 15 repeticiones. Valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

superaron significativamente al control en un 26 y 15 % respectivamente.

Las respuesta a la sensibilidad de *Aloe vera*, principalmente en la raíz y la altura, es coincidente con lo reportado por Boschi *et al.* (2017) quienes documentaron un mayor número de raicillas y longitud del tallo en estaquillas de *Origanum vulgare* para propagación, con un aporte de 150 g de gel por litro de agua; y los resultados en otras entras especies vegetales con la adición de una proporción de este compuesto en el medio de cultivo para propagación *in vitro*, donde se observó una respuesta significativa en el formación de raíces (Pulido y Becerra, 2016).

Se puede considerar que en el presente estudio la respuesta en el desarrollo que se aprecia por el efecto del GS (Figura 4), es el resultado de la interacción de los compuestos (aminoácidos, lípidos, enzimas y carbohidratos) y elementos químicos (Calcio, magnesio, potasio, zinc, sodio, cobre, hierro, manganeso, fósforo, cromo), esenciales presentes, que favorecen tal expresión a nivel de organismo (Domínguez-Fernández *et al.*, 2012). Sin embargo, es preciso destacar que parte del efecto en el desarrollo de la planta puede ser atribuido al ácido salicílico presente, ya que este compuesto en particular es capaz de incrementar el nivel de división celular del meristemo apical, el tamaño de la cofia y las raíces laterales (Echeverría-Machado *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2003), ejerciendo cambios positivos en la morfología, longitud, área, volumen, perímetro y peso fresco y seco de la raíz, tal como se ha reportado en plantas de *Glycine max* L. (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998), *Pinus patula* (San-Miguel *et al.*, 2003), *Crysanthemum morifolium* (Villanueva-Cohuo *et al.*, 2009), *Catharanthus roseus* (Echeverría-Machado *et al.*, 2007), *Lycopersicon esculentum* (Larqué-Saavedra *et al.*, 2010) y *Triticum aestivum* L.

Trabajos como las de Rodríguez-Larramendi *et al.* (2017) y Dzib-Ek *et al.* (2021) también complementan la hipótesis de que el ácido salicílico presente en el gel de sábila, podría potencializar la germinación y el desarrollo de las plántulas, puesto que en su estudio de inhibición de semillas de frijol y tomate en diferentes dosis de ácido salicílico, encontraron beneficios significativos en estas variables.



Figura 4. Desarrollo de las plántulas a los 20 y 38 días después de la siembra tratados con 5% de gel de sábila.

Figure 4. Seedling development at 20 and 38 days after sowing treated with 5% *Aloe vera* gel.

CONCLUSIÓN

La imbibición de las semillas de chile habanero en una solución con 5 % de gel de sábila redujo cuatro días el inicio de la emergencia de las plántulas y la aplicación foliar favoreció hasta en un 18 % el desarrollo radicular, la altura de la planta y biomasa fresca total; y 11 y 13 % el diámetro del tallo y número de hojas, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Adame-García, J., Murillo-Cuevas, F.D., Flores-de la Rosa, F.R., Velázquez-Mendoza, V., López-Vázquez, M., Cabrera-Mireles, H. y Antonio-Vázquez, E. 2021. Identificación molecular y evaluación de bacterias en el desarrollo vegetativo y producción de chile habanero. *Biotecnia*. 23(3): 151-157.
- Alcántara, C.J.S., Acero, G.J., Alcántara, C.J.D. y Sánchez M.R.M. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*. 17: 109-129.
- Boschi, C.L., Gandolfo, E. y Vence, L. 2017. Evaluación de gel de *Aloe vera* en el enraizamiento de estaquillas de orégano (*Origanum vulgare*). *Horticultura Argentina*. 36(89): 06-16.
- Castillo-Aguilar, C. de la C. 2018. Producción de planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agro Productividad*. 8(4): 73-78.
- Castro, R.J.J., Solís, O.M.M., Castro, R.R. y Calderón, V.C.L. 2019. Minireview: Uso de fitoreguladores en el manejo de cultivos agrícolas. *Frontera biotecnológica*. 13(3): 14-18.
- Carranza-Álvarez, C., Trinidad-García, K.L., Reyes-Hernández, H., Castillo-Pérez L.J. y Fortanelli-Martínez, J. 2021. Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biotecnia*. 23(1): 5-12.
- DOF. 2010. Declaratoria general de protección de la denominación de origen del chile habanero de la península

de Yucatán. [Consultado 30 julio 2020]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5145315&fecha=04/06/2010

- Domínguez-Fernández, R.N., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J.J., Welty-Chanes, J.S., Alvarado-González, J.S.A., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V. y Gutiérrez-López, G.F. 2011. El gel de *Aloe vera*: Estructura, Composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de ingeniería química*. 11(1): 23-43.
- Dzib-Ek, G., Villanueva-Couoh, E., Garruña-Hernández, R., Vergara, Y.S. y Larqué-Saavedra, A. 2021. Efecto del ácido salicílico en la germinación y crecimiento radicular del tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(4): 735-40.
- Echevarría-Machado, I., Escobedo G.M. and Larqué-Saavedra A. 2007. Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. *Plant physiol. Biochem*. 45: 501-507.
- Flores, L.M.L. y Sánchez, O.E. 2020. Entorno productivo del chile habanero en la Península de Yucatán, México. En *Metabolómica y cultivo del chile habanero (Capsicum chinense* Jacq) de la Península de Yucatán (332). Mérida, Yucatán: CIATEJ.
- González, T.E., Zúñiga, A.J. y Vázquez, F.F. 2018. Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán. CONACYT. Mérida, Yucatán, México. pp17-21.
- Gutiérrez-Coronado, M.A., Trejo-López, C. and Larqué-Saavedra, A. 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem*. 36: 563-565.
- Larqué-Saavedra A., Martín-Mex R., Nexticapan-Garcéz, A., Vergara-Yoisura S. y Gutiérrez-Rendón, M. 2010. Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev. Chapingo Ser. Horti*. 16: 183-187.
- Li, G., Liu, S., Sun, Z., Xia, L., Chen, G. y You, J. 2015. A simple and sensitive HPLC method based on pre-column fluorescence labelling for multiple classes of plant growth regulator determination in food samples. *Food Chemistry*. 170: 123-130.
- Lu, H., Greenberg, J.T. and Holuigue, L. 2016. Salicylic Acid Signaling Networks. *Front. Plant Sci* 7: 238. doi: 10.3389/fpls.2016.00238.
- Mendoza-Paredes, J.E., Castillo-González, A.M., Avitia-García, E., Valdez-Aguilar, L.A. y García-Mateos, M.R. 2021. Efecto de diferentes proporciones de luz, led azul: roja en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Biotecnia*. 23(1): 110-119.
- Preciado, R.P., Baca, G.A, Tirado, J.L., Kohashi-Shibata, J., Tijerina, L., Martínez, A. 2002. Nitrógeno y potasio en la producción de plántulas de melón. *Terra*. 20:267-276.
- Pita, V.J.M y Pérez, G.F. 1998. Germinación de semillas. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Hojas divulgadoras/ Número 2090 HD. Madrid España.
- Pulido, S.N. y Becerra, A.J.L. 2016. *Aloe vera (Aloe barbadensis* Miller) en la regeneración de explantes de Agra (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Cultura científica*. 14: 58-68.
- Ramírez-Luna, E., Castillo-Aguilar C. C., Aceves-Navarro E. y Carrillo-Ávila, E. 2005. Efecto de productos con reguladores de crecimiento sobre la floración y amarre de fruto en chile 'habanero'. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11(1): 93-98.

- Rodríguez-Larramendi, L.A., González-Ramírez, M., Gómez-Rincón, M.A., Guevara-Hernández, F., Salas-Marina, M. A. y Gordillo-Curiel, A. 2017. Efectos del ácido salicílico en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista De La Facultad De Agronomía De La Universidad Del Zulia. 34(3): 253-269.
- San Miguel, R., Gutiérrez M., Larqué-Saavedra, A. 2003. Salicylic acid increases the biomass accumulation of *Pinus patula*. Southern Journal of Applied Forestry. 27: 52-54. SAS, 2004. Statistical Analysis System Institute. SAS Proceeding Guide, Version 8.1. SAS Institute. Cary, NC. USA
- Shakirova, F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A. and Fatkhutdinova, D.R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Sci. 164: 317-322.
- SIACOM-NG. 2020. Módulo agrícola estatal. [Consultado 30 julio 2020]. Disponible en <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>
- SIAP. 2020. Panorama agroalimentario 2020. [Consultado 30 julio 2020] Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020
- Tucuch-Haas, C.J., Alcántar-González, G., Volke-Haller, V.H., Salinas-Moreno, S., Trejo-Téllez, L.I. y Larqué-Saavedra, A. 2016. Efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento de raíz de plántulas de maíz. Revista Mexicana de ciencias agrícolas. 7: 709-716.
- Villanueva-Couoh, E., Alcántar-González, G., Sánchez-García, P., Soria-Fregoso M. y A. Larqué-Saavedra. 2009. Efecto del ácido Salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura en Yucatán. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 15: 25-31.



Sports supplements: a health risk?

Suplementos deportivos: ¿riesgo a la salud?

Gerardo Enrique Muñoz-Maldonado¹, Víctor Manuel Gómez-Renaud², Lourdes Garza-Ocañas³, Christian Tadeo Badillo-Castañeda³

¹ Department of General Surgery, University Hospital "Dr. José Eleuterio González", School of Medicine, Autonomous University of Nuevo Leon, Nuevo Leon, Mexico.

² School of Physical Education, Autonomous University of Nuevo Leon, Nuevo Leon, Mexico.

³ Department of Pharmacology and Toxicology, School of Medicine, Autonomous University of Nuevo Leon, Nuevo Leon, Mexico.

ABSTRACT

Sports supplements are a category of dietary supplements that in recent years has not only increased in quantity and availability, but also in the number of new products. Athletes of all levels are interested in the consumption of supplements that are useful to increase muscle mass gain, thus making the consumption of these products a frequent practice. Unfortunately, there are some products that are doping substances which are offered as sports supplements; on the other hand, certain sports supplements may contain active pharmaceutical ingredients, or their analogues, not declared in their ingredients to effectively enhance the benefits that these products ensure, exposing consumers to a significant potential health risk, especially those unfamiliar with sports supplements. It is important that health professionals are aware of the possible implications of consuming certain products offered in the sports nutrition market when evaluating their patients for a variety of pathologies.

Keywords: dietary supplements, sports supplements, ergogenic aids, doping substances, adulteration, contamination

RESUMEN

Los suplementos deportivos son una categoría de los suplementos alimenticios que en los últimos años no solo ha incrementado en cantidad y disponibilidad, sino también en el número de nuevos productos. Deportistas de todos los niveles se interesan en el consumo de suplementos que son útiles para incrementar la ganancia de masa muscular convirtiendo así el consumo de estos productos en una práctica común. Desafortunadamente existen algunos productos que en realidad son sustancias dopantes que son ofertadas como suplementos deportivos, por otra parte ciertos suplementos deportivos pueden contener sustancias con actividad farmacológica o sus análogos no declarados en sus ingredientes probablemente para potenciar de manera efectiva los beneficios que estos productos aseguran, exponiendo a los consumidores a un riesgo potencial significativo a la salud, sobre todo a aquellos que no están familiarizados con los suplementos deportivos. Es importante que los profesionales de la salud tengan el conocimiento de las posibles implicaciones por el consumo de ciertos productos ofertados en el mercado de la nutrición deportiva al momento de evaluar a sus pacientes para una variedad de patologías.

Palabras clave: suplementos alimenticios, suplementos deportivos, ayudas ergogénicas, sustancias dopantes, adulteración, contaminación

INTRODUCTION

An adequate nutrition is a key component to optimize sports performance, since individual nutritional needs differ widely depending on the type of sports discipline, sports training period, training days and rest, among other factors. The nutritional strategies implemented include adjustments in energy balance, proportion and nutrient timing, as well as supplementation (Bytowski, 2018). Dietary supplements, also known as nutritional or food supplements, are a category of food products that include over-the-counter formulations consumed in addition to the usual diet, with the aim of providing additional nutrients (Augustin and Sanguansri, 2012).

The companies that market these products, associates their properties to the wide variety of ingredients in the different formulations, such as improvement in the general state of health, enhancement of the physical and mental performance, increased energy, weight loss, decreased pain and other favorable effects (Knapik *et al.*, 2016b), although the need and efficacy of certain ingredients remains under considerable debate (Kerksick *et al.*, 2018) 2082 articles were published under the key words 'sport nutrition'. Consequently, staying current with the relevant literature is often difficult. Methods: This paper is an ongoing update of the sports nutrition review article originally published as the lead paper to launch the Journal of the International Society of Sports Nutrition in 2004 and updated in 2010. It presents a well-referenced overview of the current state of the science related to optimization of training and performance enhancement through exercise training and nutrition. Notably, due to the accelerated pace and size at which the literature base in this research area grows, the topics discussed will focus on muscle hypertrophy and performance enhancement. As such, this paper provides an overview of: 1.. Dietary supplements should not contain active pharmaceutical ingredients in their formulation, since these are used to diagnose, prevent, or cure a disease. These products are not drugs and should not make any of the above claims (Edenfield, 2020).

For most countries and regions worldwide, dietary

*Autor para correspondencia: Christian Tadeo Badillo Castañeda
Correo electrónico: christian.badilloca@uanl.edu.mx

Recibido: 1 de septiembre de 2021

Aceptado: 6 de diciembre de 2021

supplements are regulated as a food category. When attempting to bring a product to the market, a notification or registration-based system is required for its approval, the acceptance and safety of the product depends in great part on the ingredients used in the formulation, which are ruled by the requirements in food additives considered by local regulations such as the Federal Commission for the Protection against Sanitary Risks (COFEPRIS) in the case of Mexico and the Food and Drug Administration (FDA) in the United States of America. This approach contrasts with the premarket approval approach required for drugs in most countries, and appropriately fits the category of foods, as these inherently pose low safety risks relative to drugs (Shao, 2017) nutraceuticals, and functional foods vary from country to country, but most include a form of premarket registration or notification, and several have no specific requirements for entry. However, in recent years countries that embraced the concept of appropriately balancing consumer access with consumer protection have begun to develop market entry requirements. From a global perspective, there has been some convergence from key markets toward the use of a notification-based market entry system for finished products. Although it is too early to know how these shifts have benefited stakeholders, the expectation is that this has reduced the cost and barriers to market entry (for both industry and government).

In sports sciences, dietary supplements are considered nutritional ergogenic aids (Lopez-Samanes *et al.*, 2015) since some of these products have an impact in the improvement of physical-athletic performance, which is the reason of why they are also known as sports supplements (Jovanov *et al.*, 2019).

A wide variety of these products are available in the market ensuring that they improve the physical performance, but only a few have scientific evidence of their benefits, in addition to the fact that the performance improvements are a function of the type of sports practice, competition level and timing at which they are consumed, which can vary widely between individuals due to several factors, including age, sex, genetics, intestinal microbiota, regular diet, among others (Maughan *et al.*, 2018).

The sports supplement industry is constantly growing and over the last decades its consumption has increased considerably, estimating that the global sports nutrition market will reach approximately 34.5 billion dollars by 2028, mainly due to the increase in product demand by bodybuilders and other athletes (Grand View Research, 2020). However, the constant innovation in these products by manufacturers to catch and keep consumers' attention, as well as trends of interest, may carry a risk in pleasing consumers in terms of what they firmly believe they need to improve their physical performance (Garthe, 2019).

SPORTS SUPPLEMENTS

Sports supplements are products formulated with food-source ingredients, as well as nutrients that are ingested

in addition to the regular diet in an adequate effective dose, that can be used in certain specific training phases with the purpose of increasing physical performance by improving adaptations to exercise, skills, recovery capacity and correction or prevention of nutritional deficiencies, as well as aiding in the body composition improvement, helping individuals to train and compete more effectively (Muñoz Maldonado *et al.*, 2021). These products can be classified according to their level of scientific evidence (Garthe and Maughan, 2018), although probably the most widely known classification by its consumers is the bodybuilding supplement classification (Navarro *et al.*, 2014). Previous research has documented that the most popular supplements consumed by bodybuilders include protein and peptide-based supplements, branched chain amino acids (BCAAs), individual amino acids, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), complex, oligomeric, or simple carbohydrates-based supplements, individual or complex vitamins and minerals, creatine, "pre-workout" supplements, "fat burners", supplements for "joint health", "testosterone boosters", among other supplements rarely used to be classified (Chappell *et al.*, 2019; 2018). The consumption and type of these products vary widely between practitioners and sports disciplines, especially in those where strength and power predominate, where the use of supplements can be considered a rule (Maughan *et al.*, 2004),

Prevalence of sports supplements consumption

Sports nutrition market primarily targets three diverse types of consumers:

- a) Bodybuilders and other professional athletes who seek to increase muscle mass through the combination of high calorie intake and resistance training (also known as weight training).
- b) Recreational athletes, since most of them do physical exercise as a hobby or are "fitness" enthusiasts, even though they do not achieve the same levels of physical effort as professional athletes.
- c) Consumers with healthy lifestyles, who do not necessarily use these products for improving their physical performance since they incorporate these supplements into their lifestyle to improve their health, replace food with beverages, nutritional bars, among others.

To attract consumers, sports nutrition companies continue to innovate their marketing and product strategies to offer products with high expectations (Agriculture and Agri-Food Canada, 2019). Unfortunately, it is difficult to obtain a complete description of the consumption prevalence of these products since different data collection methods have been used in the many studies related to this topic. When supplement use is pooled by sport discipline, sport populations, as well as the various supplement classifications, there is high variability between studies. In general, the use of supplements among men and women who are professional athletes is 69% and 71% respectively, whereas for recreational athletes is 48% and 42%, thus being similar

the consumption of these products among people from both groups. Furthermore, some athletes tend to consume supplements in up to 100% of individuals depending on the type of sport and the level of competition (Knapik *et al.*, 2016a). On the other hand, among recreational teen athletes, around 60% have mentioned the use of sports supplements, 42% of which, state using more than one type of supplement with high frequency of consumption, and up to 86% do not verify the nutritional label of the chosen supplement (Tsarouhas *et al.*, 2018).

In the case of bodybuilders, up to 87% of these athletes at the amateur level are consumers of sports supplements (Montuori *et al.*, 2021), while of professional bodybuilders, 100% use these products (Sánchez-Oliver *et al.*, 2019). Recently, other sports disciplines at a professional level have exhibited a high prevalence of consumption such as cycling (86%), watersports (77%), and weightlifting (75%). In turn, in team sports such as American football and soccer, similar frequencies of up to 57% and 75% have been observed, respectively (Baltazar-Martins *et al.*, 2019). Interestingly, in athletics, long and medium distance athletes are the largest consumers of sports supplements with frequencies of 76% and 72%, respectively, followed by sprinting and obstacle course with up to 58% in both disciplines (Tabata *et al.*, 2020).

A large part of the studies related to the consumption prevalence of these products concludes a marked trend towards greater use of sports and herbal supplements. In general, athletes have conventionally been the largest consumers of sports supplements, representing more than a third of the overall market. However, the growing population of recreational athletes and individuals with a "fitness" lifestyle creates a new dimension of potential consumers for the manufacturers and sellers of these products, with an increasing trend of multi-ingredient supplements and varied content of biologically active compounds (Garthe, 2019). Another aspect to be considered is the commonness of the situation in which consumers exceed the recommended doses and timing of supplement consumption, which may be due to the belief that "more is better" (Maughan *et al.*, 2004). Moreover, it is a fact that supplementation is a frequently self-prescribed practice and without adequate medical or nutritional assessment, since the relevant information and recommendations usually come from other athletes, personal trainers, friends, or even relatives (Tsarouhas *et al.*, 2018). Likewise other media such as bodybuilding magazines (Iraki *et al.*, 2019), as well as online resources such as forums and social networks, are important sources of information and influence, although unfortunately the information presented in these media does not always have scientific support (Waller *et al.*, 2019).

Although estimates of the general use of dietary supplements are available in national surveys, these studies have used different categorizations, and most lacking specific data for these products (Geller *et al.*, 2015). It is important to note that during 2008, Mexico was the second largest international market for sports supplements with 192 million

dollars in sales to retailers alone. If we consider that sports supplements sales have increased significantly, it would not be surprising that currently our country continues to maintain or has even surpassed this position (Muñoz Maldonado *et al.*, 2021).

PERFORMANCE-ENHANCING DRUGS OFFERED AS SPORTS SUPPLEMENTS

Currently, a wide range of possible performance-enhancing substances is available, mostly offered through the internet as sports supplements (Joseph and Parr, 2014), as "safe" and "legal" alternatives to performance-enhancing drugs (Abbate *et al.*, 2015). This, present a high prevalence of consumption by, but not limited to, bodybuilders (Sánchez-Oliver *et al.*, 2019), and between sports where strength and power predominate (Jokipalo and Khudayarov, 2021).

As such, these products from the black market often contain active pharmaceutical ingredients without prior authorization by the corresponding national regulatory entities, no clinical approval and/or even without authorization for human use, and therefore without a known complete toxicological profile. Additionally, the lack of quality control and the incorrect labeling of these products implies potential health risks, although unfortunately, this situation does not limit the use and abuse by the consumers. Although until the early 2000s these products were almost exclusively steroidal prohormones and designer steroids, nowadays the selective androgen receptor modulators (SARMs) are also available, which are synthesized from several pharmacophores (Geldof *et al.*, 2017).

Designer steroids

Taking advantage of the ease and convenience for obtaining food supplements, certain manufacturers carry out chemical modifications to existing anabolic androgenic steroids (AAS), in order to avoid legal controls regarding the manufacture and supply of current medicines; the synthesized compounds are called "designer steroids" and are marketed as sports supplements (Voelker *et al.*, 2019). The term "designer drug" was originally introduced to describe new substances that are synthesized from known substances of abuse, preserving, or enhancing pharmacological effects while remaining outside of legal control; currently this term is broadened to include substances that are derived from industrial or academic research, but never receive medical approval. Some designer drugs may be approved in some countries, and in a strict sense, they should not be considered as such as they do not conform to the classical definition (Luethi and Liechti, 2020). Designer steroids are offered as supplements or ingredients in some of these products for muscle mass gain, commonly referred to misleading and incorrect terms such as "testosterone boosters", "natural steroids" and "prohormones" (Rahnema *et al.*, 2015). The term prohormone refers to the precursors, in this case, of the steroid hormone testosterone such as dehydroepiandrosterone (DHEA), an-

drostenedione, androstenediol or other similar compounds. They have also been sold as "andro-supplements", stating that these active ingredients are converted into testosterone or its analogues, to improve adaptations to resistance training. Even though it has been shown that the use of steroidal prohormones does not provide any ergogenic benefit, their use is widely extended, despite their consumption is prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA) and different sports governing organizations (Brown *et al.*, 2006).

Designer steroids are typically manufactured and sold by smaller scale companies that often dissolve or change their name when they meet resistance from regulatory agencies (Rahnema *et al.*, 2015). In the United States, the Designer Anabolic Steroid Control Act of 2014 expanded the list of anabolic steroids regulated by the Drug Enforcement Administration (DEA), thus decreasing their sale and acquisition. However, the continued synthesis of new designer steroids by manufacturers means that these compounds are not on the current banned substance lists (Brown, 2017).

Just like testosterone, designer steroids share common mechanisms of action by interacting at the androgen receptor, as well as aromatization and 5- α reduction for some of these compounds. Like all androgens, the parameters by which they are characterized differ among the different compounds as they exhibit varying proportions of anabolic and androgenic activity. Most designer steroids are formulated to be consumed orally with varying degrees of bioavailability through 17- α alkylation, however this modification increases the compound toxicity. On the other hand, it seems that the benefits from the use of these products are minimal and even non-existent, compared to the considerable number of adverse health effects. Like exogenous androgens, designer steroids have the potential to cause reversible adverse effects such as hypertension, secondary hypogonadism, infertility, as well as polycythemia and adverse changes in lipoprotein subfractions. There is evidence that some designer steroids can cause more permanent adverse effects, such as hepatotoxicity, cardiotoxicity, and ischemic stroke (Rahnema *et al.*, 2015). It is noteworthy to mention that evaluations of their side effects or metabolism in humans is scarce, making the continuous synthesis of new compounds even more difficult to determine. In addition to the above mentioned effects, designer steroids may also show side effects related to the activation of other steroid receptors, such as the glucocorticoid receptor (Joseph and Parr, 2014). Since designer steroids are derived from anabolic androgenic steroids, their use has been banned by sports' governing organizations since athletes who consume these products may result in a positive doping test for anabolic steroids (Kazlauskas, 2010).

A study published in the UK (Abbate *et al.*, 2015) accurate mass liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) investigated the presence and estimate of specific active substances amounts present in a total of 24 "prohormone supplements" selected according to information available on the internet from sellers, bodybuilding forums discussing these products, as well as consumers familiar with

these products. The samples were purchased from different distributors such as gym equipment stores and online stores that claimed on the product label the different designer steroids content. Of the samples analyzed, one of them did not contain any steroids and about 70% were substituted products containing classic steroids (such as DHEA, methyl-1-testosterone, 4-androstenedione, desoxymethyltestosterone, methasterone, androst-4-en-3, 11,17-trione and furazabol) other than those indicated on the label. In addition, the spelling of some of the chemical names for the active compounds was incorrect, probably in order to hide the true ingredients from both consumers and regulatory agencies. All identified compounds were controlled or potentially controlled substances in the UK under the Misuse of Drugs Act 1971. Furthermore, the estimated amounts for 17-alkylated steroids equaled or exceeded the established therapeutic doses for this type of drugs.

Selective androgen receptor modulators

In an attempt to mitigate the risks associated with the administration of testosterone and other AAS in pathologies that result in the loss of muscle mass and function, as well as in hormone replacement therapies, SARMs were developed, which have a targeted therapeutic effect through binding to the androgen receptor in muscle and bone tissues (Thevis and Schänzer, 2018). The pharmacophores present in SARMs have an unprecedented potential for chemical modifications, these include steroidal substances such as testosterone itself and non-steroids such as aniline, aryl-propionamides, benzimidazole, bicyclic hydantoins, bridged tricyclics, diarylaniline, indole, quinolones, tetrahydroquinolones, tricyclics and pyrazoline derivatives (Machek *et al.*, 2020).

In various clinical trials, certain SARMs have shown improvements in fat-free mass in healthy men, sarcopenic and postmenopausal women, as well as the cancer population, although the effects on the muscular strength and physical performance increase remain inconsistent, and with unknown effects of its long-term use. Just like androgens, SARMs have adverse effects, although to a lesser degree compared to the use of testosterone. In clinical trials, a decrease in high-density lipoproteins (HDL), hepatotoxicity with an increase in liver transaminases and alterations in plasma levels of anabolic hormones involved in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis have been reported. To date, and despite their clinical potential, none of the existing SARMs are approved for human use in any country, even though some have progressed to phase II and III trials (Fonseca *et al.*, 2020) undesirable side effects have raised concerns about prostatic hypertrophy in men as well as virilization in women. Selective androgen receptor modulators (SARMs). Unfortunately, SARMs have attracted the attention of athletes as novel compounds due to their anabolic effects and few side effects, and because of this, the WADA has placed SARMs on the list of banned substances since 2008 due to the potential high risk of abuse (Temerdashev and Dmitrieva, 2020).

There are two recent studies (references) conducted to contrast the precision of the labeling with respect to composition and concentration, considering the claims of various products offered as SARMS. It is worth mentioning that in the samples from both investigations up to 20 – 55% of the products mentioned the liability exemptions of “not suitable for human consumption” and/or “for research purposes only”; nevertheless, some of them detailed the information of the suggested portion. Also, between 45 – 85% of the products were sold as sports supplements and some of the products were stacks containing different multiple SARMS.

A study carried out in the United States of America (Van Wagoner *et al.*, 2017) reported that 44 products purchased from 21 online distributors in the same country were analyzed. Some manufacturers and distributors used the term SARM on the product label and advertising, although they were not selective modulators of androgen receptor. These included the agonist compounds of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR δ) GW501516, growth hormone secretagogue ibutamoren, nuclear receptor agonist Rev-ErbA- α SR9009, and the anabolic compound 5 α -hydroxy-laxogenin, all of them included in the WADA list of prohibited substances and without scientific evidence of the efficacy or safety of these substances. Chemical analysis determined that, of the 44 products, 73% matched the active substance indicated on the label, however, only 18 products contained the declared amount, three products contained additional prohibited substances, and 11 products differed with a lower amount. Furthermore, in eight products, the active substances were not found, but were replaced by other prohibited substances in lower amounts, and in four products, no active substances were found.

Similar findings were found in the UK (Leaney *et al.*, 2021), derived from an analysis of 20 products available in the UK market purchased from 12 manufacturers online. Of the total of the products evaluated, only 30% were consistent with the label content, while 35% had at least one active substance absent in the content. In addition, two products substituted with different prohibited active substances, one product did not contain the presence of any active substance, and nine products with amounts less than those indicated.

HEALTH CONCERNS RELATED TO THE CONSUMPTION OF SOME SPORTS SUPPLEMENTS

It is important to know that certain sports supplements may contain substances prohibited by WADA, which are performance-enhancing drugs not labeled in the ingredients of the product (Martínez-Sanz *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2016) year after year. Related to the high rates of use, unintentional doping occurs. Unintentional doping refers to positive anti-doping tests due to the use of any supplement containing unlisted substances banned by anti-doping regulations and organizations, such as the World Anti-Doping Agency (WADA), and they can even contain plant compounds

that have no history of human use and are often used as ingredients to mask banned substances (Jędrejko *et al.*, 2021).

When the content of active ingredients in a supplement is variable, it is due to inadequate quality control during the manufacturing process. However, there is also evidence that some products do not contain the indicated amount of the highest value ingredients declared on the label and, in some cases, the active ingredient is completely absent and the product contains only low-cost materials, even relatively inexpensive ingredients may be absent or present in trivial amounts (Maughan *et al.*, 2011). Poor manufacturing practices can likely lead to cross-contamination of supplements on the same production line (Geyer *et al.*, 2008), but in most cases it is deliberately by the manufacturers themselves in order to obtain more noticeable effects claimed by their product (Odoardi *et al.*, 2015). Supplements that are intentionally added with illegal substances or with pharmacological activity not declared on the nutritional label are called adulterated supplements (Ronis *et al.*, 2018). These products could be problematic as they expose professional athletes to inadvertent doping, as well as potential health risks for consumers in general, due to the inadvertent intake of substances with pharmacological activity. These risks go beyond the inherent effects of consuming these substances in high amounts, polypharmacy, and the fact that some of these are often not tested in humans and the effects when combined with exercise are unknown (Mathews, 2018).

The health consequences caused by adulterated and/or contaminated sports supplements are unclear, due to the lack of precise reports on adverse events. Also, some side effects are not acute events, but could appear as delayed and chronic health problems (Eichner and Tygart, 2016). The presented data in the case reports of adverse events associated with the use of adulterated sports supplements are difficult to collect, due to incomplete information such as the lack of the product name or manufacturer, and confounding variables such as drug addiction of the individual, concomitant medication, and other pre-existing risks. The main factors that influence the reliability of these reports are the product identity and quality, unfortunately most of the supplements are not properly identified, analyzed or characterized in the reports, which makes it difficult to assign or determine the product (Gardiner *et al.*, 2008). Also, most patients do not report on supplement use, causing physician to be unable to identify associated adverse events as frequently as they do with pharmaceuticals, in addition to possible limited knowledge of drug-supplement interactions (Geller *et al.*, 2015).

It is well known that the acquisition of sports supplements is well known that the acquisition of sports supplements is due to their easy accessibility and availability through websites, supplement stores and gyms without the need for any type of prescription or clinical approval. Additionally, the number of supplements from the informal market has increased dramatically in recent decades due

to high demand from consumers (Odoardi *et al.*, 2015). An example of sports supplements that may present a greater risk of adulteration and/or contamination are supplements for muscle mass gain (Kulkarni *et al.*, 2017; Pomeranz *et al.*, 2015).

Sports supplements for muscle mass gain

These products have the objective of increasing the anabolic response in the muscle induced by resistance training, these include a wide variety of supplements with nutritional ingredients (Yager and McLean, 2020). Some products included in the supplement category for muscle mass gain are:

- a) Protein and multi-ingredient protein-based supplements

Most of these products are milk, egg, and plant-based protein and peptide powders that are reconstituted with the addition of water, juice, or milk (De Ceglie *et al.*, 2015) as ingredients, amino acids and proteins with important nutritional values as milk, soy and egg proteins. An EU Food Supplements Directive (2002). They are also found in combination with other safe and authorized nutritional ingredients, such as mixtures with different proteins and/or peptides, carbohydrates, amino acids (individual or combined), creatine, β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB), PUFAs, vitamins, minerals (O'Bryan *et al.*, 2020), and some plant compounds (Directo *et al.*, 2019), to mention just a few examples.

- b) Mass gainers, weight gainers or muscle gainers

These hypercaloric supplements are designed for those individuals who find it difficult to gain muscle mass. Most of these products contain a high amount of carbohydrates and proteins making them a good replacement for some meals (Wójcicki, 2020).

- c) Testosterone boosters (T-boosters)

They are supplements with different herbal ingredients in combination with minerals and vitamins, in complexes or individually, being the plant material *Tribulus terrestris* the most widely known (Balasubramanian *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019). T-boosters claim to improve muscle strength and endurance while increasing blood testosterone levels, as well as inhibiting its conversion to estrogen, thus stimulating muscle hypertrophy, statements from the internet or other means that try to encourage the use of T-boosters. The supposed beneficial effects is attractive for bodybuilders and professional athletes, however, the effectiveness and safety of these supplements is questionable (Herriman *et al.*, 2017; Pokrywka *et al.*, 2014). Various other ingredients and their combinations, to date, have not been shown to be conclusively effective in supporting the claims these products make (Clemesha *et al.*, 2020).

Different international research groups have analyzed the undeclared presence of AAS, steroidal prohormonal compounds and designer steroids in sports supplements for muscle mass gain, since 1999 through chromatographic methods, due to the relationship between positive doping cases and sports supplements. Studies carried out in the early

2000s provided the first evidence that some non-hormonal supplements based on proteins, creatine and even vitamins and minerals had the presence of prohibited substances in around 15% of a sample of 634 supplements purchased from 13 countries, including 215 different distributors (Geyer *et al.*, 2008). The presence of AAS as adulterants was reported with five steroid hormones in up to 18% of products, from a sample of 28 protein and amino acid supplements combining other permitted ingredients (Martello *et al.*, 2007).

This situation seems to be highly prevalent in sports supplements for muscle mass gain, since currently, in the Netherlands, Duiven *et al.* (2021) evaluated a total of 66 products that claimed to modulate hormonal regulation, stimulate muscle mass gain, increase fat loss and/or increase energy, selected from 21 different brands and purchased from 17 online stores. A total of 21 products (32%) contained the presence of at least five different AAS, 1,4-androstenediene-3,17-dione (boldione) being mostly detected in 11 products, followed by 5-androstene-3 β ,17 α -diol, in addition to DHEA, testosterone, and 5-androstenedione. On the other hand, in Iran (Alaedini *et al.*, 2021) was determined that up to 37% of a sample of 30 non-hormonal sports supplements selected from 12 different brands, purchased in pharmacies and the formal market, contained at least one of the AAS. The greatest relevance in the list of substances banned from WADA found, included 4-androstenedione and methyl-1-testosterone. Also, stanozolol and 5 α -hydroxy-laxogenin have been found in protein and amino acid supplements in South Korea (Lee *et al.*, 2020) and in Italy, in up to 10% of products identified as amino acids. These, are also consumed by professional athletes, and are adulterated with DHEA, while the same percentage for herbal products have come to contain dehydroepiandrosterone acetate (DHEA-acetate), methylandrostenediol, clasterone, testosterone propionate, 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol y progesterone (Micalizzi *et al.*, 2021).

Designer steroids have also been found with increasing regularity, in products offered as all natural herbal supplements marketed for muscle mass and strength gain, as is the recently reported androsta-3,5-diene-7,17-dione, an aromatase inhibitor, which is included in the WADA banned list. Although little is currently known about the pharmacological effects and/or toxicity of this compound, its structure is similar to that of AAS which are known to cause significant health risks (Lorenz *et al.*, 2019).

Supplements adulterated with these substances, should be considered for having significant pharmacological activity when consumed chronically. Health consequences of inadvertent use of steroidal prohormones and designer steroids (in addition to the adverse effects mentioned above), could include cholestasis, kidney failure, gynecomastia, acne, psychological dependence, among others. Ingestion by women could cause absence of menstruation, virilization, alopecia and clitoromegaly (Mathews, 2018). In adolescents, the risk is greater since consumption, even in insignificant amounts, can suppress testosterone production for months,

as well as cardiovascular risks and mood alterations. Similarly, it can cause premature epiphyseal closure, brain remodeling and an increased risk of maladaptive behaviors and neurological disorders (Eichner and Tygart, 2016).

On the other hand, the SARM ostarine has been detected as an undeclared ingredient in several supplements, which opens the possibility that other SARMs are present as adulterants in sports supplements for muscle mass gain, leading to cases of inadvertent doping (Walpurgis *et al.*, 2020),

Inadvertent doping prevention programs as tools for advice and recommendations when selecting sports supplements

According to current scientific evidence, the risk that any sports and dietary supplement, in general containing a variety of substances with undeclared pharmacological activity, is close to 15% of the total of these products (Oustram and Stewart, 2015). Not only AAS have been found as adulterants, but also has a variety of substances such as phosphodiesterase-5 inhibitors and antihistamines, found in supplements to improve sexual performance and blood pressure respectively (Kim *et al.*, 2017). Also found, are glucocorticoids and non-steroidal anti-inflammatory analgesics in herbal supplements for pain management (Garza-Ocañas *et al.*, 2013), as well as sympathomimetic agents, anorectics, and pancreatic lipase inhibitors in weight loss supplements (Ronis *et al.*, 2018). All of these substances are also prohibited by WADA since their consumption through these products has incurred in cases of positive doping, such is the case of Mexican professional athletes (Proceso, 2011).

Some programs try to protect athletes who consume sports supplements from inadvertent doping, the best known being the Sports Supplements Regulatory Framework of the Australian Institute of Sport (2021). This is designed for the specific needs of Australian sports organizations, to promote their use based on scientific evidence and other practical considerations that determine whether the product is safe, permissible and effective in enhancing athletic performance.

In recent years, laboratory tests for the detection of prohibited substances in sports supplements have been available to anyone interested, such as athletes, sports organizations, national anti-doping agencies and manufacturers of these products (Garthe and Ramsbottom, 2020) without the need for any further or additional supplementation. Nevertheless, the perception, from times of antiquity to the present day, is that taking additional food nutrients will enhance performance. A common rationale for use of supplements by athletes is to gain a 'competitive edge'. Current data suggests that the prevalence of supplement use among athletes is in the 40–70 % range, depending on the sport and definition or categorization of supplement. Athletes (youth/adult. Various third-party companies offer supplement analysis services for quality, purity, and composition. These must be free of conflicts of interest, have external accreditation, perform audits for good manufacturing practices, and have validated and accredited methods to analyze prohibited substances. When

approved, the supplement brand will receive the corresponding approval seal to be displayed on the product label; some of these companies are Consumer Labs (consumerlab.com), National Sanitation Foundation (NSF.org), Banned Substances Control Group (bscg.org) and Informed-Choice/Informed-Sport (informed-sport.com). These companies offer a variety of services that include certification of facilities and raw materials, compliance with good manufacturing practices, label verification and testing of the final product. The cost of these services can be an issue for small companies and larger companies may not see any market advantage in certification and will not consider this additional scrutiny. However, it is impossible to affirm that a product is free of all prohibited substances because it is not possible to analyze all of them due to the continuous synthesis of new adulterants. In summary, supplement certification cannot completely eliminate the risk of a product being contaminated, but it does have strong evidence of reduced risk (Mathews, 2018).

In Mexico, the National Association of Food Supplements Industry (ANAISA) integrated of accredited dietary supplement companies (including sports supplements), determine those products that meet the regulatory requirements indicated by authorities in our country such as the Secretariat of Health, COFEPRIS and the Office of the Federal Prosecutor for the Consumer (PROFECO). These, have the purpose of protecting the consumer from the increasing bombardment of advertising and sale of products that potentially endanger the population's health, like the programs above. The accredited products have a certification seal, in addition to outreach program of technical and scientific information, to promote regulatory improvement through the generation of proposals aligned with global trends (Asociación Nacional de la Industria de los Suplementos Alimenticios, 2021).

CONCLUSIONS

The consumption of active pharmaceutical ingredients, steroidal prohormones and designer steroids, offered as sports supplements for muscle mass gain, in addition to other ergogenic effects, as well as the inadvertent consumption of the same substances in sports supplements, is a potentially risk situation difficult to estimate, not only for professional sports but also for the consumers' health. This, due to the acute or chronic exposure of a wide range of substances with pharmacological activity in unknown quantities that have a variety of adverse effects that are not even fully determined yet. It is important to note that, although the percentage of supplement adulteration and/or contamination in general may seem minimal (around 15% of the total), there are minimal studies that have analyzed significant amounts of the great diversity of these products from the national market. Thus, there is no precise data on the approximation to this figure in Mexico, which is one of the main consumers of these products internationally.

When elaborating a routine medical history, it usually includes a patient questioning about drug use and drug addiction. However, due the disclosure of sports supple-

ments or products, they probably will not be considered due to the belief that these do not cause damage to health. The latter, under the argument that they are not drugs or because are offered with statements such as being of natural origin and without adverse effects, or being safe and legal alternatives for other types of substances. Therefore, the authors encourage doctors and other health professionals who consider asking about the use of these products when relevant to perform a differential diagnosis. Similarly, it is necessary to standardize studies related to the consumption prevalence of these products with appropriate definitions and contextualization, since these play a key role in the assessment and quantification of risks to public and individual health.

It is not the intention of the authors to suggest that all sports supplements are likely to cause harm to the consumer's health, or lead to cases of positive doping in professional sports. There are ingredients and products whose scientific evidence has shown their effectiveness and safety when properly consumed and for their purpose. Instead, we highlight the importance of health professionals' involvement to mitigate the potential risks that the consumption of certain sports supplements entails, that could be adulterated and/or contaminated. In addition, this will produced additional elements to consider when assessing the causes of some pathologies, as well as issue the pertinent recommendations for the differentiation and consumption of these products.

REFERENCES

- Abbate, V., Kicman, A.T., Evans-Brown, M., Mcveigh, J., Cowan, D.A., Wilson, C., Coles, S.J., Walker, C.J. 2015. Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements – A significant risk to public health. *Drug Testing and Analysis*. 7: 609-618. <https://doi.org/10.1002/dta.1728>
- Agriculture and Agri-Food Canada. Custom reports service – Sports nutrition products market – Europe. [Accessed 30 July 2021] 2019. Available at: <https://agriculture.canada.ca/en/international-trade/market-intelligence/reports/custom-reports-service-sports-nutrition-products-market-europe>
- Alaedini, S., Amirahmadi, M., Kobarfard, F., Rastegar, H., Nasirahmadi, S., Shoeibi, S. 2021. Survey of protein-based sport supplements for illegally added anabolic steroids methyltestosterone and 4-androstenedione by UPLC-MS/MS. *Steroids*. 165: 108758. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108758>
- Asociación Nacional de la Industria de los Suplementos Alimenticios. [Accessed 11 August 2021] 2021. Available at: <https://anaisa.mx/>
- Augustin, M.A., Sanguansri, L. 2012. Challenges in developing delivery systems for food additives, nutraceuticals and dietary supplements. In: *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. N. Garti and M. Julian (ed.), pp 19-48. Woodhead Publishing Limited, Philadelphia. <https://doi.org/10.1533/9780857095909.1.19>
- Australian Institute of Sport. Australian Institute of Sport Position Statement: Supplements and sports foods in high performance sport. [Accessed 15 July 2021] 2021. Available at: https://www.ais.gov.au/__data/assets/pdf_file/0014/1000841/Position-Statement-Supplements-and-Sports-Foods-abridged_v2.pdf
- Balasubramanian, A., Thirumavalavan, N., Srivatsav, A., Yu, J., Lipshultz, L.I., Pastuszak, A.W. 2019. Testosterone imposters: An analysis of popular online testosterone boosting supplements. *The Journal of Sexual Medicine*. 16: 203-212. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2018.12.008>
- Baltazar-Martins, G., Brito de Souza, D., Aguilar-Navarro, M., Muñoz-Guerra, J., Plata, M.D.M., Del Coso, J. 2019. Prevalence and patterns of dietary supplement use in elite Spanish athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 16: 30. <https://doi.org/10.1186/s12970-019-0296-5>
- Brown, A.C. 2017. An overview of herb and dietary supplement efficacy, safety and government regulations in the United States with suggested improvements. Part 1 of 5 series. *Food and Chemical Toxicology* 107: 449-471. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.001>
- Brown, G.A., Vukovich, M., King, D.S. 2006. Testosterone prohormone supplements. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 38: 1451-1460. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000228928.69512.2e>
- Bytowski, J.R. 2018. Fueling for Performance. *Sports Health*. 10: 47-53. <https://doi.org/10.1177/1941738117743913>
- Chappell, A.J., Simper, T., Barker, M.E. 2018. Nutritional strategies of high level natural bodybuilders during competition preparation. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 15: 4. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0209-z>
- Chappell, A.J., Simper, T., Helms, E. 2019. Nutritional strategies of British professional and amateur natural bodybuilders during competition preparation. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 16: 35. <https://doi.org/10.1186/s12970-019-0302-y>
- Clemesha, C.G., Thaker, H., Samplaski, M.K. 2020. 'Testosterone boosting' supplements composition and claims are not supported by the academic literature. *The World Journal of Men's Health*. 38: 115-122. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190043>
- De Ceglie, C., Calvano, C.D., Zamboni, C.G. 2015. MALDI-TOF MS for quality control of high protein content sport supplements. *Food Chemistry*. 176: 396-402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.038>
- Directo, D., Wong, M.W.H., Elam, M.L., Falcone, P., Osmond, A., Jo, E. 2019. The effects of a multi-Ingredient performance supplement combined with resistance training on exercise volume, muscular strength, and body composition. *Sports*. 7: 152. <https://doi.org/10.3390/sports7060152>
- Duiven, E., van Loon, L.J.C., Spruijt, L., Koert, W., de Hon, O.M. 2021. Undeclared doping substances are highly prevalent in commercial sports nutrition supplements. *Journal of Sports Science & Medicine*. 20: 328-338. <https://doi.org/10.52082/jssm.2021.328>
- Edenfield, K.M. 2020. Sports supplements: Pearls and pitfalls. *Primary Care - Clinics in Office Practice*. 47: 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2019.10.002>
- Eichner, A., Tygart, T. 2016. Adulterated dietary supplements threaten the health and sporting career of up-and-coming young athletes. *Drug Testing and Analysis*. 8: 304-306. <https://doi.org/10.1002/dta.1899>
- Fonseca, G.W.P.D., Dworatzek, E., Ebner, N., Von Haehling, S. 2020. Selective androgen receptor modulators (SARMs) as

- pharmacological treatment for muscle wasting in ongoing clinical trials. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 29: 881-891. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1777275>
- Gardiner, P., Sarma, D.N., Dog, T.L., Barrett, M.L., Chavez, M.L., Ko, R., Mahady, G.B., Marles, R.J., Pellicore, L.S., Giancaspro, G.I. 2008. The state of dietary supplement adverse event reporting in the United States. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. 17: 962-970. <https://doi.org/10.1002/pds.1627>
- Garthe, I. 2019. Dietary supplements and elite athletes: when nature becomes high risk. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. 9: 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.07.004>
- Garthe, I., Maughan, R.J. 2018. Athletes and supplements: Prevalence and perspectives. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 28: 126-138. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2017-0429>
- Garthe, I., Ramsbottom, R. 2020. Elite athletes, a rationale for the use of dietary supplements: A practical approach. *PharmaNutrition*. 14: 100234. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2020.100234>
- Garza-Ocañas, L., Badillo-Castañeda, C.T., Montoya-Eguía, S.L., Saenz-Chávez, P.L., Garza-Ulloa, H. 2013. Confirmación de dexametasona y diclofenaco por LC-MS-MS como adulterantes en un producto herbolario. *Salud Pública de México*. 55: 498. <https://doi.org/10.21149/spm.v55i5.7250>
- Geldof, L., Pozo, O.J., Lootens, L., Morthier, W., Van Eenoo, P., Deventer, K. 2017. In vitro metabolism study of a black market product containing SARM LGD-4033. *Drug Testing and Analysis*. 9: 168-178. <https://doi.org/10.1002/dta.1930>
- Geller, A.I., Shehab, N., Weidle, N.J., Lovegrove, M.C., Wolpert, B.J., Timbo, B.B., Mozersky, R.P., Budnitz, D.S. 2015. Emergency Department Visits for Adverse Events Related to Dietary Supplements. *The New England Journal of Medicine*. 373: 1531-1540. <https://doi.org/10.1056/nejmsa1504267>
- Geyer, H., Parr, M.K., Koehler, K., Mareck, U., Schänzer, W., Thevis, M. 2008. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *Journal of Mass Spectrometry*. 43: 892-902. <https://doi.org/10.1002/jms.1452>
- Grand View Research. Sports Nutrition Market Size & Growth Report, 2020-2027. [Accessed 31 August 2021] 2021. Available at: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/sports-nutrition-market>
- Herriman, M., Fletcher, L., Tchaconas, A., Adesman, A., Milanaik, R. 2017. Dietary supplements and young teens: Misinformation and access provided by retailers. *Pediatrics*. 139: e20161257. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-1257>
- Iraki, J., Fitschen, P., Espinar, S., Helms, E. 2019. Nutrition Recommendations for Bodybuilders in the Off-Season: A Narrative Review. *Sports*. 7: 154. <https://doi.org/10.3390/sports7070154>
- Jędrzejko, K., Lazur, J., Muszyńska, B. 2021. Risk associated with the use of selected ingredients in food supplements. *Chemistry & Biodiversity*. 18: e2000686. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000686>
- Jokipalo, I., Khudayarov, A. 2021. A Netnography and a survey on doping use among competitive doping-untested strength-sport athletes. *International Journal of Sports Medicine*. 42: 645-650 <https://doi.org/10.1055/a-1342-7312>
- Joseph, J., Parr, M., 2014. Synthetic androgens as designer supplements. *Current Neuropharmacology*. 13: 89-100. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666141210224756>
- Jovanov, P., Đorđić, V., Obradović, B., Barak, O., Pezo, L., Marić, A., Sakač, M. 2019. Prevalence, knowledge and attitudes towards using sports supplements among young athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 16: 27. <https://doi.org/10.1186/s12970-019-0294-7>
- Kazlauskas, R. 2010. Designer steroids, in: *Doping in sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis*. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 195. D. Thieme and P. Hemmersbach (ed.), pp. 155-185. Springer, Berlin. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4_7
- Kerksick, C.M., Wilborn, C.D., Roberts, M.D., Smith-Ryan, A., Kleiner, S.M., Jäger, R., Collins, R., Cooke, M., Davis, J.N., Galvan, E., Greenwood, M., Lowery, L.M., Wildman, R., Antonio, J., Kreider, R.B. 2018. ISSN exercise & sports nutrition review update: Research & recommendations. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 15: 38. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0242-y>
- Kim, E.H., Seo, H.S., Ki, N.Y., Park, N.H., Lee, W., Do, J.A., Park, S., Baek, S.Y., Moon, B., Oh, H. Bin, Hong, J. 2017. Reliable screening and confirmation of 156 multi-class illegal adulterants in dietary supplements based on extracted common ion chromatograms by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1491: 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.032>
- Knapik, J.J., Steelman, R.A., Hoedebecke, S.S., Austin, K.G., Farina, E.K., Lieberman, H.R. 2016a. Prevalence of dietary supplement use by athletes: Systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*. 46: 103-123. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0387-7>
- Knapik, J.J., Trone, D.W., Austin, K.G., Steelman, R.A., Farina, E.K., Lieberman, H.R. 2016b. Prevalence, adverse events, and factors associated with dietary supplement and nutritional supplement use by US Navy and Marine corps personnel. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 116: 1423-1442. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.02.015>
- Kulkarni, A., Huerto, R., Roberto, C.A., Austin, S.B. 2017. Leveraging corporate social responsibility to improve consumer safety of dietary supplements sold for weight loss and muscle building. *Translational Behavioral Medicine*. 7: 92-97. <https://doi.org/10.1007/s13142-016-0434-4>
- Leaney, A.E., Beck, P., Biddle, S., Brown, P., Grace, P.B., Hudson, S.C., Mawson, D.H. 2021. Analysis of supplements available to UK consumers purporting to contain selective androgen receptor modulators. *Drug Testing and Analysis*. 13: 122-127. <https://doi.org/10.1002/dta.2908>
- Lee, J.H., Han, J.H., Min, A.Y., Kim, H., Shin, D. 2020. Screening for twenty-eight target anabolic-androgenic steroids in protein supplements using QuEChERS extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants - Part A*. 37: 1425-1436. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1773543>
- Lopez-Samanes, A., Ortega Fonseca, J.F., Fernandez Elias, V.E., Borreani, S., Mate-Munoz, J.L., Kovacs, M.S. 2015. Nutritional ergogenic aids in tennis: A brief review. *Strength and Conditioning Journal*. 37: 1-11. <https://doi.org/10.1519/SSC.0000000000000141>
- Lorenz, L.M., Toomey, V.M., Lanzarotta, A.C., Flurer, R.A., Falconer, T.M. 2019. Identification of the designer steroid androsta-3,5-diene-7,17-dione in a dietary supplement. *Drug Testing and Analysis*. 11: 1109-1115. <https://doi.org/10.1002/dta.2589>

- Luethi, D., Liechti, M.E. 2020. Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. *Archives of Toxicology*. 94: 1085-1133. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02693-7>
- Machek, S.B., Cardaci, T.D., Wilburn, D.T., Willoughby, D.S. 2020. Considerations, possible contraindications, and potential mechanisms for deleterious effect in recreational and athletic use of selective androgen receptor modulators (SARMs) in lieu of anabolic androgenic steroids: A narrative review. *Steroids*. 164: 108753. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108753>
- Martello, S., Felli, M., Chiarotti, M. 2007. Survey of nutritional supplements for selected illegal anabolic steroids and ephedrine using LC-MS/MS and GC-MS methods, respectively. *Food Additives & Contaminants*. 24: 258-265. <https://doi.org/10.1080/02652030601013729>
- Martínez-Sanz, J.M., Sospedra, I., Ortiz, C.M., Baladía, E., Gil-Izquierdo, A., Ortiz-Moncada, R. 2017. Intended or unintended doping? A review of the presence of doping substances in dietary supplements used in sports. *Nutrients*. 9: 1093. <https://doi.org/10.3390/nu9101093>
- Mathews, N.M. 2018. Prohibited contaminants in dietary supplements. *Sports Health*. 10: 19-30. <https://doi.org/10.1177/1941738117727736>
- Maughan, R.J., Burke, L.M., Dvorak, J., Larson-Meyer, D.E., Peeling, P., Phillips, S.M., Rawson, E.S., Walsh, N.P., Garthe, I., Geyer, H., Meeusen, R., Van Loon, L., Shirreffs, S.M., Spriet, L.L., Stuart, M., Vernec, A., Currell, K., Ali, V.M., Budgett, R.G.M., Ljungqvist, A., Mountjoy, M., Pitsiladis, Y., Soligard, T., Erdener, U., Engebretsen, L. 2018. IOC consensus statement: Dietary supplements and the high-performance athlete. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 28: 104-125. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0020>
- Maughan, R.J., Greenhaff, P.L., Hespel, P. 2011. Dietary supplements for athletes: Emerging trends and recurring themes. *Journal of Sports Sciences*. 29: S57-S66. <https://doi.org/10.1080/02640414.2011.587446>
- Maughan, R.J., King, D.S., Lea, T. 2004. Dietary supplements. *Journal of Sports Sciences*. 22: 95-113. <https://doi.org/10.1080/0264041031000140581>
- Micalizzi, G., Huszti, K., Pálincás, Z., Mandolfino, F., Martos, É., Dugo, P., Mondello, L., Utczás, M. 2021. Reliable identification and quantification of anabolic androgenic steroids in dietary supplements by using gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*. 13: 128-139. <https://doi.org/10.1002/dta.2929>
- Montuori, P., Loperto, I., Paolo, C., Castrianni, D., Nubi, R., De Rosa, E., Palladino, R., Triassi, M. 2021. Bodybuilding, dietary supplements and hormones use: behaviour and determinant analysis in young bodybuilders. *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*. 13: 147. <https://doi.org/10.1186/s13102-021-00378-x>
- Muñoz Maldonado, G.E., Ochoa Ahmed, F.A., Díaz Ochoa, E.A., Ramírez Orozco, R.E., Gómez Renaud, V.M. 2021. Suplementos deportivos: ¿Cómo definimos a estos productos? *Lux Médica*. 16. <https://doi.org/10.33064/48lm20213235>
- Navarro, V.J., Barnhart, H., Bonkovsky, H.L., Davern, T., Fontana, R.J., Grant, L., Reddy, K.R., Seeff, L.B., Serrano, J., Sherker, A.H., Stolz, A., Talwalkar, J., Vega, M., Vuppalachchi, R. 2014. Liver injury from herbals and dietary supplements in the U.S. Drug-Induced Liver Injury Network. *Hepatology*. 60: 1399-1408. <https://doi.org/10.1002/hep.27317>
- O'Bryan, K.R., Doering, T.M., Morton, R.W., Coffey, V.G., Phillips, S.M., Cox, G.R. 2020. 54: 573-581 Do multi-ingredient protein supplements augment resistance training-induced gains in skeletal muscle mass and strength? A systematic review and meta-analysis of 35 trials. *British Journal of Sports Medicine*. 54: 573-581. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099889>
- Odoardi, S., Castrignanò, E., Martello, S., Chiarotti, M., Strano-Rossi, S. 2015. Determination of anabolic agents in dietary supplements by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants - Part A*. 32: 635-647. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1014868>
- Outram, S., Stewart, B. 2015. Doping through supplement use: A review of the available empirical data. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 25: 54-59. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2013-0174>
- Pokrywka, A., Obmiński, Z., Malczewska-Lenczowska, J., Fijałek, Z., Turek-Lepa, E., Grucza, R. 2014. Insights into supplements with tribulus terrestris used by athletes. *Journal of Human Kinetics*. 41: 99-105. <https://doi.org/10.2478/hukin-2014-0037>
- Pomeranz, J.L., Barbosa, G., Killian, C., Austin, S.B. 2015. The dangerous mix of adolescents and dietary supplements for weight loss and muscle building: Legal strategies for state action. *Journal of Public Health and Management & Practice*. 21: 496-503. <https://doi.org/10.1097/PHH.0000000000000142>
- Proceso. Los estragos de un "producto milagro". [Accessed 8 July 2021] 2011. Available at: <https://www.proceso.com.mx/reportajes/2011/3/10/los-estragos-de-un-producto-milagro-84745.html>
- Rahnema, C.D., Crosnoe, L.E., Kim, E.D. 2015. Designer steroids – over-the-counter supplements and their androgenic component: Review of an increasing problem. *Andrology*. 3: 150-155. <https://doi.org/10.1111/andr.307>
- Rocha, T., Amaral, J.S., Oliveira, M.B.P.P. 2016. Adulteration of dietary supplements by the illegal addition of synthetic drugs: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15: 43-62. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12173>
- Ronis, M.J.J., Pedersen, K.B., Watt, J. 2018. Adverse effects of nutraceuticals and dietary supplements. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 58: 583-601. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052844>
- Sánchez-Oliver, A.J., Grimaldi-Puyana, M., Domínguez, R. 2019. Evaluation and behavior of spanish bodybuilders: Doping and sports supplements. *Biomolecules*. 9: 122. <https://doi.org/10.3390/biom9040122>
- Santos, H.O., Howell, S., Teixeira, F.J. 2019. Beyond tribulus (*Tribulus terrestris* L.): The effects of phytotherapies on testosterone, sperm and prostate parameters. *Journal of Ethnopharmacology*. 235: 392-405. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.033>
- Shao, A. 2017. Global market entry regulations for nutraceuticals, functional foods, dietary/food/health supplements. in: *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*. B. Debasis and N. Sreejayan (ed.), pp 279-290. Academic Press, London. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802780-6.00015-8>

Tabata, S., Yamasawa, F., Torii, S., Manabe, T., Kamada, H., Namba, A., Kato, J., Kaneko, H., Tahara, K., Tsukahara, Y., Sato, K. 2020. Use of nutritional supplements by elite Japanese track and field athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 17: 38. <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00370-9>

Temerdashev, A.Z., Dmitrieva, E. V. 2020. Methods for the determination of selective androgen receptor modulators. *Journal of Analytical Chemistry*. 75: 835-850. <https://doi.org/10.1134/S1061934820070187>

Thevis, M., Schänzer, W. 2018. Detection of SARMs in doping control analysis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 464: 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.040>

Tsarouhas, K., Kioukia-Fougia, N., Papalexis, P., Tsatsakis, A., Kouretas, D., Bacopoulou, F., Tsitsimpikou, C. 2018. Use of nutritional supplements contaminated with banned doping substances by recreational adolescent athletes in Athens, Greece. *Food and Chemical Toxicology*. 115: 447-450. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.043>

Van Wagoner, R.M., Eichner, A., Bhasin, S., Deuster, P.A., Eichner, D. 2017. Chemical composition and labeling of substances marketed as selective androgen receptor modulators and sold via the internet. *Journal of the American Medical Association*. 318: 2004-2010. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.17069>

Voelker, S.E., Lorenz, L.M., Litzau, J.J. 2019. Semi-quantitative determination of designer steroids by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection in the absence of reference material. *Drug Testing and Analysis*. 11: 428-434. <https://doi.org/10.1002/dta.2511>

Waller, M.C., Kerr, D.A., Binnie, M.J., Eaton, E., Wood, C., Stenvers, T., Gucciardi, D.F., Goodman, C., Ducker, K.J. 2019. Supplement use and behaviors of athletes affiliated with an Australian state-based sports institute. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 29: 518-525. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0336>

Walpurgis, K., Thomas, A., Geyer, H., Mareck, U., Thevis, M. 2020. Dietary supplement and food contaminations and their implications for doping controls. *Foods*. 9: 1012. <https://doi.org/10.3390/foods9081012>

Wójcicki, K. 2020. FTIR spectroscopy for quality evaluation of sports supplements on the Polish market. *Foods and Raw Materials*. 8: 177-185. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-177-185>

Yager, Z., McLean, S. 2020. Muscle building supplement use in Australian adolescent boys: relationships with body image, weight lifting, and sports engagement. *BMC Pediatrics*. 20: 89. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-1993-6>

Condiciones de maceración y fermentación que incrementan el contenido de etanol en mosto fermentado para whisky de malta

Mashing and fermentation conditions that increase ethanol content in fermented wort for single malt whisky

María Teresa Rivera Jiménez¹, Ramon Huerta Zurita^{2*}, María Guadalupe Herrera Hernández², Violeta Herrera Enciso¹, Carlos Alberto Flores Gómez¹

¹ Tecnológico Nacional de México, Campus Roque, Celaya, Guanajuato, México.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México. *rhzurita@yahoo.com.mx

RESUMEN

El contenido de etanol en mosto fermentado es el parámetro más importante para la producción de whisky en términos de volumen de destilado por unidad de malta. La biosíntesis de etanol durante la fermentación de mosto depende de muchos factores; no obstante, la cantidad inicial de carbohidratos fermentables afecta significativamente el contenido final de etanol en el mosto fermentado. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes condiciones de maceración y fermentación sobre el contenido de etanol en mosto fermentado; asimismo, determinar las condiciones que contribuyen en el incremento de este compuesto. Se observó que la maceración isotérmica a 65 °C por 3 h, con una relación malta:agua 1:3, resulta en mostos con mayor contenido de carbohidratos fermentables. Además, se determinó que el mejor rendimiento de etanol se obtiene con fermentadores cerrados a 20 °C en mostos de 12.5 °P. Lo anterior resulta en una eficiencia de 0.34 g de etanol/g de sólidos solubles; además de la reducción significativa de metanol y glicerol.

Palabras clave: whisky, malta, maceración, fermentación, rendimiento de etanol.

ABSTRACT

Ethanol content in fermented wort is the most important parameter for whisky production, in terms of volume of distillate per unit of malt. Ethanol biosynthesis during wort fermentation depends on many factors, however, the initial concentration of fermentable carbohydrates significantly affects the final ethanol content in fermented wort. The objective of this study was to evaluate the effect of different mashing and fermentation conditions on ethanol content in fermented wort, and to determine the conditions that better contribute to the increase of this compound. It was observed that an isothermal mashing of 65 °C for 3 h, with a 1:3 grist:water ratio, results in worts with high fermentable carbohydrates content. In addition, it was determined that the higher ethanol yield is attained with closed fermenters at 20 °C and 12.5 °P worts. These conditions result in a conversion efficiency of 0.34 g of ethanol/g of soluble solids, in fermented worts with reduced amounts of methanol and glycerol.

Key words: whisky, malt, mashing, fermentation, ethanol yield.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos en la industria de bebidas fermentadas y destiladas es la generación eficiente de etanol debido a que este parámetro define el volumen final de producto obtenido por unidad de materia prima (Stewart, 2009; Nicol, 2014). Esto ha sido una constante en bebidas alcohólicas de mucha tradición como la cerveza y el whisky, mismas que comparten ciertas similitudes en cuanto a su procesamiento (Bathgate, 2016). A pesar de que ambas bebidas se pueden elaborar con otros granos como maíz, centeno, trigo y cebada no malteada; es necesaria la inclusión de una porción de malta de cebada en las recetas, o de otras fuentes de enzimas en caso de ser permitido, para la adecuada conversión del almidón en azúcares fermentables durante la maceración (Agu *et al.*, 2006; Bathgate, 2016). Se ha reportado que la variación en las condiciones de maceración determina el rendimiento y composición del mosto; no obstante, la mayoría de estos reportes se han dado con fines cerveceros (Evans *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2011). Tanto en cervecería como en destilería se busca la obtención de mostos con alto contenido de azúcares fermentables; sin embargo, mientras que en cervecería se busca un balance adecuado entre azúcares fermentables y límite dextrinas debido a que éstas últimas contribuyen en el cuerpo de la cerveza, en destilería se busca maximizar el desdoblamiento del almidón para la mayor generación posible de etanol, parámetro comúnmente denominado '*spirit yield*' (Lyons, 2003; Bathgate, 2016). Durante la fermentación, tanto la concentración de azúcares fermentables como de compuestos nitrogenados determinan en gran medida la eficiencia de la levadura en la síntesis de etanol (Stewart *et al.*, 2013). Además, existen otros factores como la alta concentración de sólidos en mosto que incrementan la presión osmótica del medio y que afectan en consecuencia la estabilidad celular de las levaduras durante la fermentación (Nevoigt y Stahl, 1997; Cronwright *et al.*, 2002). A pesar de las similitudes que comparten en algunas etapas de proceso la cervecería y la destilería, los mayores avances

*Autor para correspondencia: Ramon Huerta Zurita
 Correo electrónico: rhzurita@yahoo.com.mx

Recibido: 6 de abril de 2021

Aceptado: 18 de agosto de 2021

tecnológicos post fermentación se han dado en el ámbito cervecero debido a requerimientos de calidad de cerveza que se asocian a su estabilidad coloidal, aceptación y vida de anaquel (Sadosky *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2004; Miedl *et al.*, 2005; Vanderhaegen *et al.*, 2006). A diferencia de la cerveza, en bebidas destiladas como el whisky, muchos de los compuestos generados durante la fermentación permanecen en el residuo de destilación considerando que el principal objetivo de esta etapa del proceso es la eficiente recuperación y concentración de etanol (Nicol, 2014). Debido al hecho de que las etapas post fermentación no implican síntesis de etanol durante el procesamiento de whisky, las condiciones de maceración y fermentación se vuelven determinantes en la generación de este compuesto. Dada la amplia variabilidad de condiciones de maceración y fermentación en el procesamiento de whisky, tanto a nivel comercial como artesanal (Bringinghurst y Brosnan, 2014; Fukuyo y Myojo, 2014; Lyons, 2014; Quinn, 2014), el objetivo de este trabajo fue estudiar las condiciones de proceso que afectan y contribuyen en el contenido final de etanol en mosto fermentado. De esta forma, se busca contribuir en la uniformidad de condiciones en etapas pre destilación para la eficiente generación de etanol en la producción de whisky de malta; especialmente en el nivel artesanal, donde el número de destilerías ha crecido sustancialmente en la última década.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio constó de experimentos secuenciales donde el mejor tratamiento de cada experimento evaluado se utilizó como base para el experimento subsecuente. En esta sección sólo se describen los experimentos y sus tratamientos; mientras que, en la sección de resultados y discusión, se describen y discuten los resultados que sustentaron la toma de decisiones.

En todos los experimentos se utilizó una malta comercial elaborada a partir de cebada de dos hileras con las siguientes características de calidad determinadas en laboratorio conforme los métodos oficiales de la *American Society of Brewing Chemists* (ASBC, 2009): humedad, 5 %; extracto molienda fina, 85 % base seca (b.s.); extracto molienda gruesa, 84 % b.s.; proteína total (PT), 11 % b.s.; proteína soluble, 5.3 % b.s.; alfa-amilasa, 65 unidades de dextrinificación a 20 °C (U.D. 20 °C) b.s.; poder diastásico (DP), 135 grados ASBC (°ASBC) b.s.; friabilidad, 92 %; viscosidad de mosto, 1.52 centipoise (cP); amino nitrógeno libre (FAN), 200 ppm; y color de mosto, 2.0 grados del *Standard Reference Method* de la ASBC (°SRM).

Este estudio se dividió en dos fases. En la fase 1 se evaluaron diferentes tratamientos para determinar las mejores condiciones de maceración; mientras que en la fase 2, se buscaron las mejores condiciones de fermentación. Para la molienda de malta en la fase 1 se utilizó un molino de discos para laboratorio Bühler DLFU (Bühler Group, Uzwil, Suiza), el cual se ajustó para que el 90 % de la malta molida pasara la criba US No. 30 (0.595 mm); lo cual equivale a la molienda

fina de malta conforme el método oficial Malt-4 de la ASBC (ASBC, 2009). Para las pruebas de fermentación, donde se evaluó mayor cantidad de mosto y por tanto de malta molida, la molienda se llevó a cabo utilizando un molino de tres rodillos con tolva y motor marca nacional. La apertura entre los rodillos principales de este molino se ajustó para garantizar una retención sobre la criba US No. 30 de 75±1 %; equivalente a la molienda gruesa de malta. Debido a la diferencia en tamaños de partícula, el filtrado en la fase 1 se llevó a cabo con papel Ahlstrom No. 509 (Ahlstrom-Munksjö, Helsinki, Finlandia); mientras que el filtrado en la fase 2 en un recipiente cilíndrico de 5 L (con 25 cm de diámetro) provisto de salida circular en el fondo de 1 cm de diámetro que permitió la formación adecuada de la torta de filtrado facilitando el clarificado de mosto. La maceración de los tratamientos en ambas fases se llevó a cabo en un macerador de laboratorio Micromat™ (Micromat Co., Mahwah, NJ, USA).

Fase 1

Experimento 1: Temperaturas de maceración

Tratamiento 1. Se pesaron 50 g de malta molida y se mezclaron con 200 mL de agua destilada a 67 °C en vasos de níquel de 500 mL. Inmediatamente se colocaron en el macerador, el cual se mantuvo a 65 °C con agitación constante (100 rpm) durante 5 h. Sin embargo, dos vasos fueron retirados después de 1 h, dos a las 2 h, dos a las 4 h y tres a las 5 h. Los vasos se enfriaron a 20 °C y el contenido de cada uno se ajustó a 450 g con agua destilada a 20 °C previo al filtrado. Este ajuste de peso se llevó a cabo en todos los tratamientos de la fase 1.

Tratamiento 2. Las condiciones de maceración y muestreo en este tratamiento fueron similares a las del tratamiento 1; con la diferencia de que la maceración se llevó a cabo a 60 °C.

Tratamiento 3. Las cantidades de malta molida y agua en este tratamiento fueron similares al tratamiento 1, pero con diferentes temperaturas de maceración en un tiempo total de 5 h (50 °C, 1 h; 55 °C, 1 h; 60 °C, 1 h; 65 °C, 2 h). En este tratamiento no se hicieron muestreos intermedios.

Experimento 2: Tiempo de maceración

El mejor tratamiento en el experimento 1 fue la maceración isotérmica a 65 °C. En consecuencia, se buscó determinar el mejor tiempo a dicha temperatura. Se utilizó la misma relación malta:agua de 1:4 (50 g malta + 200 mL agua); sin embargo, en este caso los tratamientos fueron 1 h, 2 h, 3 h y 4 h de maceración a 65 °C.

Experimento 3: Relación malta-agua

El mejor tratamiento en el experimento 2 fue la maceración isotérmica a 65 °C por 3 h. Debido a que la relación malta:agua utilizada en los experimentos 1 y 2 fue 1:4, que es la comúnmente utilizada en la elaboración de whisky, en este experimento se evaluaron las relaciones malta:agua 1:3 (50 g malta + 150 mL agua) y 1:5 (50 g malta + 250 mL agua); incluyendo la 1:4 nuevamente como testigo.

Fase 2**Experimento 4: Concentración de sólidos en mosto durante la fermentación**

En este experimento se evaluaron las condiciones de fermentación a diferentes niveles de sólidos solubles (grados Plato, °P) iniciales en mosto. Los mostos se obtuvieron de una maceración a 65 °C por 3 h en una relación malta:agua de 1:3. En este caso, tal como se observaría en un proceso comercial, el filtrado se llevó a cabo a través de la misma masa espesa que actúa como barrera donde las cascarillas de la malta facilitaron esta operación; misma que duró aproximadamente 40 min para 1.6 kg de malta en maceración. Este tiempo incluyó el retorno (recirculación) del mosto turbio (ca. 1.5 L) al recipiente de filtración una vez que la cama de filtrado generó mosto clarificado. Los tratamientos evaluados fueron 10 °P, 11.25 °P, 12.5 °P, 13.75 °P, 15 °P, 16.25 °P, y 17.5 °P. Para lograr estos niveles de sólidos solubles, en todos los casos se generaron mostos altamente concentrados (20 ± 0.5 °P) y se diluyeron con un volumen calculado de agua destilada para el ajuste de sólidos en solución en función de los valores de gravedad específica, densidad del mosto a 20 °C y el peso total de los sólidos en el mosto concentrado. De cada tratamiento se fermentaron 3 L de mosto con la levadura Fermentis SafAle™ S-04 (Grupo Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, Francia). El inóculo se preparó con la adición de 1.725 g de levadura liofilizada a 300 mL de mosto tibio (35 °C); el cual se dejó reposar por 10 minutos para adecuada rehidratación. Posteriormente, el mosto inoculado se agitó vigorosamente y se mezcló con el resto del mosto a fermentar (2.7 L) en contenedores de vidrio ámbar de 4 L provistos de una trampa de oxígeno o 'air lock'. El tiempo de fermentación fue de 7 días (168 h) a 20 °C. Para el análisis de variables respuesta, el mosto fermentado se filtró al vacío con papel Whatman® GF/B (tamaño de poro de 1 µm) y de esta forma eliminar la levadura suspendida.

Experimento 5: Temperatura y condiciones de fermentación

Se evaluaron tres diferentes temperaturas de fermentación (20, 25 y 30 °C) en mostos con la mejor concentración inicial de sólidos observada en el experimento 4 (i.e. 12.5 °P). Las maceraciones se llevaron a cabo a 65 °C por 3 h en una relación malta:agua de 1:3. La preparación del inóculo, tiempo de fermentación, y filtrado se llevó a cabo de forma similar a lo descrito en el experimento 4. Además, en este experimento se evaluaron condiciones de fermentación abierta (i.e. fermentación sin *air lock*) y cerrada (i.e. fermentación con *air lock*) a las temperaturas mencionadas.

Variables respuesta y análisis estadístico

En los experimentos 1-4 se utilizaron diseños experimentales completamente al azar; mientras que en el experimento 5 se usó un arreglo factorial para evaluar el efecto combinado de temperatura (factor A) y condiciones de fermentación (factor B) sobre las variables respuesta. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento y la prueba de

medias utilizada fue Tukey ($\alpha=0.05$). En el análisis de datos se utilizó el programa SAS versión 9.3 (SAS, 2011). Las variables respuesta en la fase 1 fueron contenido (g 100 mL⁻¹) de maltosa, glucosa, fructosa y maltotriosa en mosto; además de la suma de éstos como carbohidratos fermentables totales (CF) y la fracción más fermentable (CF+) que excluye a la maltotriosa, carbohidrato parcialmente consumido durante la fermentación (Stewart, 2009). Debido a que todos los macerados en la fase 1 se ajustaron al mismo peso (450 g) previo al filtrado, no se observó variación significativa en el contenido de sólidos (~8.9 °P) de los mostos resultantes; por lo que este parámetro no se consideró como una variable respuesta. Asimismo, el FAN en mosto no fue un factor limitante para el desarrollo de la levadura debido a que las 200 ppm observadas garantizan una fermentación eficiente (Hill y Stewart, 2019). En la fase 2, las variables respuesta fueron contenido de etanol (% v/v), rendimiento de etanol (g etanol/g sólidos solubles), metanol (% v/v) y glicerol (g L⁻¹); además del contenido de CF residuales, con los que se calculó la fermentabilidad de CF en función de la reducción porcentual de CF inicial - CF residual. Para el cálculo de la variable rendimiento de etanol se tomó como volumen base 100 mL, donde se dividió el etanol (g) presente en dicho volumen de mosto fermentado entre la cantidad de sólidos (g) presentes en el mismo volumen de mosto sin fermentar.

El análisis de CF en mosto, así como los derivados de fermentación (etanol, metanol y glicerol), se llevó a cabo por HPLC en un cromatógrafo marca Agilent Technologies 1100, provisto de un detector de índice de refracción y una columna Aminex® HPX-87H de 300 x 7.8 mm marca Bio-Rad. Se inyectaron 20 µL de muestra filtrada (0.45 µm) en una fase móvil de ácido sulfúrico 0.008M a un flujo de 0.6 mL min⁻¹, con temperatura de la columna de 65°C. Los valores de CF se determinaron utilizando una mezcla estándar en g 100 mL⁻¹ como lo indica el método Wort-14 de los métodos oficiales de la ASBC (ASBC, 2009). El análisis de etanol (% v/v), metanol (% v/v) y glicerol (g L⁻¹) se llevó a cabo utilizando los cromatogramas con las áreas respuesta de estos compuestos diluidos a diferentes concentraciones en agua destilada (muestras estándar). Las áreas respuesta de cada muestra estándar se graficaron para obtener curvas de regresión lineal; mismas que se utilizaron para calcular su concentración en mosto fermentado a partir del área respuesta observada en el mismo tiempo de retención que la muestra estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Fase 1**

Los resultados del experimento 1 (Tabla 1) mostraron que después de 5 h de maceración isotérmica a 60 °C o 65 °C se genera mayor concentración de CF en mosto en comparación con la maceración de temperaturas escalonadas (50-55-60-65 °C). Asimismo, los muestreos intermedios en las maceraciones isotérmicas mostraron que después de 2 h de maceración se cuenta con el 90 % de CF determinados en 5 h; mientras que con 4 h de maceración el valor de CF fue mayor a 99 % en ambos tratamientos isotérmicos. Similar a

Tabla 1. Contenido de carbohidratos fermentables (g 100 mL⁻¹) en mostos de tres tratamientos de maceración a diferentes temperaturas (experimento 1).**Table 1.** Fermentable carbohydrates content (g 100 mL⁻¹) in worts, from three mashing treatments at different temperatures (experiment 1).

| Tratamiento* | Glucosa | Fructosa | Maltosa | Maltotriosa | CF** | CF+*** |
|--------------|---------|----------|---------|-------------|--------|--------|
| 1 | 1.25a | 0.26a | 5.24a | 1.08b | 7.84a | 6.76a |
| 2 | 1.05a | 0.21a | 5.26a | 1.17ab | 7.69ab | 6.52a |
| 3 | 1.40a | 0.23a | 4.60b | 1.18a | 7.41b | 6.23b |

*1: 65 °C, 5 h; 2: 60 °C, 5 h; 3: 50 °C, 1 h; 55 °C, 1 h; 60 °C, 1 h; 65 °C, 2h **C.F.=

Carbohidratos fermentables totales. ***Carbohidratos más fermentables.

Medias con diferente letra entre tratamientos implican diferencia significativa (Tukey, $\alpha=0.05$).

estos resultados, Evans *et al.* (2005) reportaron que las temperaturas iniciales de maceración, mantenidas por al menos 50 min, afectan la composición del mosto en términos de CF. Ellos evaluaron temperaturas iniciales en el rango 45-76 °C y observaron que la temperatura de 65 °C produce mostos con mayor contenido de CF; mientras que a temperaturas superiores se observa una rápida reducción de maltosa a expensas del incremento de carbohidratos no fermentables como maltotetraosa. El incremento de este carbohidrato se debe principalmente a que, mientras la beta amilasa pierde actividad a temperaturas altas (>65 °C) dejando de generar maltosa, la alfa amilasa se mantiene estable; generando múltiples oligosacáridos, incluyendo la maltotetraosa (Muralikrishna y Nirmala, 2005; Henson *et al.*, 2014). En este estudio, se observó un incremento significativo en el contenido de maltosa cuando se maceró a 60 y 65 °C en comparación con la maceración de temperaturas escalonadas; cuyos valores promedio fueron 5.26, 5.24 y 4.60 g 100 mL⁻¹, respectivamente. El contenido de maltosa observado en los mostos de las maceraciones isotérmicas por 5 h es significativamente mayor a otros reportados a similar temperatura de maceración con fines cerveceros. Por ejemplo, Evans *et al.* (2005) reportaron un contenido de maltosa en mosto de 4.72 g 100 mL⁻¹ en una maceración de 50 min a 65 °C con posterior incremento a 70 °C mantenidos por 30 min; mientras que Schwarz *et al.* (2007) reportaron un valor de maltosa de 4.76 g 100 mL⁻¹ en un tiempo de 2 h a 65 °C con incremento posterior a 75 °C mantenidos por 10 min. Respecto al contenido total de CF en mosto, ambos autores reportaron valores en el rango 6.2-6.8 g 100 mL⁻¹; mientras que los valores de este parámetro en el experimento 1 estuvieron en el rango 7.4-7.8 g 100 mL⁻¹. Estas diferencias se deben a que en cervecería la degradación enzimática de la amilopeptina es parcial, por lo que en un mosto cervecero es común observar que la maltosa constituye el 50-60 % del total de carbohidratos; mientras que las dextrinas el 20-30 % (Stewart, 2009). Por el contrario, en mostos para whisky se busca la mayor degradación posible del almidón; por lo que la presencia de dextrinas debe reducirse al mínimo con el objetivo de lograr el mayor rendimiento de etanol por unidad de malta (Lyons, 2003). En este estudio, se estima que la presencia de carbohidratos no fermentables (dextrinas + oligosacáridos) en los mostos evaluados con 8.9 °P fue menor a 15 % en la maceración escalonada, y menor a 12 % y 10 % en las maceraciones isotérmicas a 60 y 65 °C, respectiva-

mente. Esta estimación se llevó a cabo asumiendo que 90-92 % de los sólidos en mosto son carbohidratos (Willaert, 2007) y que el valor de proteína soluble de la malta utilizada (5.3 % b.s.) equivale, considerando 85 % de extracto de malta, a 0.56 °P (6.3 % de 8.9 °P); además de que la concentración reportada del tercer componente menor en mosto (i.e. lípidos) generalmente equivale a <0.002 °P (<20 mg L⁻¹) de los sólidos cuando se macera a 65 °C (Evans *et al.*, 2012). Considerando lo anterior, además de la relación porcentual CF+/CF que fue de 86 %, 85 % y 84 % para los tratamientos 1, 2 y 3, respectivamente, se determinó que la mejor condición de maceración en el experimento 1 es isotérmica a 65 °C. El incremento de la relación porcentual CF+/CF implica mayor fermentabilidad del total de carbohidratos fermentables en mosto en función de la reducción del carbohidrato parcialmente fermentable, maltotriosa. El hecho de que los muestreos intermedios bajo las condiciones isotérmicas del experimento 1 hayan mostrado que después de 4 h de maceración ya no existen incrementos significativos de CF, justificó este tiempo como el máximo a evaluar en el experimento 2. Se observó que no existe diferencia en la generación de CF cuando se macera por tres o cuatro horas a 65 °C (Tabla 2). A pesar de que las temperaturas de maceración utilizadas en la producción de whisky de malta oscilan en el rango 55-65 °C; los tiempos de maceración (sin contabilizar el tiempo de filtrado de mosto) generalmente varían entre 1 y 2.5 h. El parámetro que influye en la variabilidad de estos tiempos es DP, cuyas enzimas constituyentes (alfa amilasa, beta amilasa, límite dextrinasa, y alfa glucosidasa; i.e. enzimas diastásicas) son las responsables de desdoblar el almidón a CF (Evans *et al.*, 2010). En esta investigación, se utilizó una malta con poder diastático intermedio; sin embargo, es posible que con un DP mayor (>150 °ASBC), el tiempo de maceración para lograr el máximo contenido de CF podría haber presentado una ligera reducción. No obstante, el uso maltas con alto DP en la producción de whisky de malta tiene el inconveniente de que existe una correlación positiva entre DP y PT; así como negativa entre PT y extracto de malta (Huerta *et al.*, 2014). Esto se debe a que la enzima que mayor contribuye al DP, beta amilasa (Gibson *et al.*, 1995), está ligada al contenido total de proteína en cebada debido a que la síntesis y acumulación de esta enzima se da en la etapa de llenado de grano durante el desarrollo del cultivo de cebada; lo cual explica su alta correlación con las hordeínas (Qi *et al.*, 2006; Wei *et al.*,

Tabla 2. Contenido de carbohidratos fermentables (g 100 mL⁻¹) en mostos de diferentes tiempos de maceración isotérmica a 65 °C (experimento 2).**Table 2.** Fermentable carbohydrates content (g 100 mL⁻¹) in worts, at different times of 65 °C isothermal mashing (experiment 2).

| Tratamiento* | Glucosa | Fructosa | Maltosa | Maltotriosa | CF** | CF+*** |
|--------------|---------|----------|---------|-------------|--------|--------|
| 1 | 0.98a | 0.17b | 5.26a | 1.23a | 7.64a | 6.40a |
| 2 | 1.01a | 0.17ab | 5.33a | 1.27a | 7.77a | 6.51a |
| 3 | 1.04a | 0.18ab | 5.50b | 1.23a | 7.95b | 6.72b |
| 4 | 1.04a | 0.19a | 5.48ab | 1.25a | 7.96ab | 6.71ab |

*1: 65 °C, 1 h; 2: 65 °C, 2 h; 3: 65 °C, 3 h; 4: 65 °C, 4 h. **C.F.=Carbohidratos fermentables totales. ***Carbohidratos más fermentables. Medias con diferente letra entre tratamientos implican diferencia significativa (Tukey, $\alpha=0.05$).

2009). En consecuencia, a mayor PT, mayor DP; pero menor extracto de malta. En la elaboración de whiskies de grano, donde se utilizan granos sin maltear más una proporción de malta de cebada, es deseable que las maltas utilizadas posean un alto DP; sin embargo, en whisky de malta se observaría una reducción no deseable de rendimiento de etanol debido a la reducción en extracto de malta. Es por esta razón que las especificaciones de DP para maltas destinadas a un whisky de malta indican valores menores a 150 °ASBC; mientras que para las maltas destinadas a un whisky de grano el DP puede ir más allá de 200 °ASBC (Bringhurst y Brosnan, 2014; AMBA, 2021). Por lo tanto, es poco probable que el tiempo óptimo de maceración de 3 h determinado en esta investigación para la producción de whisky de malta se reduzca de forma considerable debido al efecto negativo de usar maltas con alto DP y reducido extracto de malta en el rendimiento de etanol.

Por otro lado, con los resultados del experimento 3 se observó que la condición isotérmica a 65 °C por 3 h y relación malta:agua 1:3 genera mayor contenido de maltosa y CF+ (Tabla 3). A pesar del mayor valor promedio de CF en los mostos de la relación 1:3, no se observó diferencia estadística de este parámetro entre los tres tratamientos del experimento 3, lo cual pudo deberse a la mayor dispersión de valores de CF que mostraron los mostos 1:4 y 1:5. Sin embargo, esto no ocurrió con CF+, donde sí se observa diferencia significativa y favorable a la relación 1:3; misma que presentó la mayor relación porcentual CF+/CF (85.4 %). En estudios previos, los altos valores de CF en mostos con menor relación malta:agua han sido vinculados a la estabilidad térmica de las enzimas diastásicas; cuya tolerancia a altas temperaturas es mayor en soluciones con cierto nivel de sólidos que cuando éstas se encuentran aisladas (Muller, 1991; Stenholm y Home, 1999; Evans *et al.*, 2011). Si bien el contenido de CF se reduce significativamente a temperaturas altas (>70 °C), el efecto es

menor a medida que incrementa la concentración de sólidos durante la maceración. Evans y Fox (2017) reportaron que bajo las condiciones de maceración del Mosto Congreso, con temperaturas de maceración en el rango 45-70 °C y relación malta:agua 1:4 (ASBC, 2009), la actividad de beta amilasa en la malta de diferentes variedades de cebada se reduce drásticamente (de 85 % a <10 %) cuando el macerado transcurre en el rango de temperatura 65-70 °C; mientras que en la maceración isotérmica a 65°C, con relación malta:agua 1:3, la beta amilasa retiene 40-70 % de su actividad después de 60 min. A pesar de que Evans y Fox (2017) no reportaron el perfil de carbohidratos en los mostos obtenidos, sus observaciones respecto al comportamiento de beta amilasa permiten entender la razón del alto contenido de maltosa y CF+ en mostos de maceraciones isotérmicas a 65°C; asumiendo que esta enzima mantiene cierta actividad residual después de 3 h de incubación.

Fase 2

Con la maceración isotérmica a 65 °C por 3 h y relación malta:agua 1:3 se obtuvieron los mostos para los experimentos de fermentación. Debido a que el ajuste de sólidos previo a la fermentación de los diferentes tratamientos se hizo a partir de mostos altamente concentrados (20±0.5 °P), se observó un incremento proporcional en cuanto a carbohidratos fermentables en los tratamientos del experimento 4 (Tabla 4). Sin embargo, como se esperaba, la relación porcentual CF+/CF a diferentes niveles de sólidos en mosto se mantuvo sin mayor variación (83.3±0.3 %); así como el contenido porcentual de maltosa respecto a CF, que osciló en el rango 66-68 %. El valor de CF+/CF en este experimento es ligeramente menor al observado (85.4 %) bajo las mismas condiciones de maceración de la fase 1; no obstante, esta diferencia se atribuye al molido grueso llevado a cabo en esta etapa con el fin de emular condiciones comerciales. Al incrementar el

Tabla 3. Contenido de carbohidratos fermentables (g 100 mL⁻¹) en mostos de maceraciones isotérmicas (65 °C, 3 h) y diferentes relaciones malta:agua (experimento 3).**Table 3.** Fermentable carbohydrates content (g 100 mL⁻¹) in worts from isothermal mashings (65 °C, 3 h), and different grist:water ratios (experiment 3).

| Tratamiento* | Glucosa | Fructosa | Maltosa | Maltotriosa | CF** | CF+*** |
|--------------|---------|----------|---------|-------------|-------|--------|
| 1 | 1.09a | 0.19a | 5.16a | 1.10b | 7.55a | 6.45a |
| 2 | 0.99b | 0.18a | 4.91b | 1.16b | 7.25a | 6.09b |
| 3 | 0.96b | 0.18a | 5.11ab | 1.26a | 7.47a | 6.22ab |

*1=1:3; 2=1:4; 3=1:5. **C.F.=Carbohidratos fermentables totales. ***Carbohidratos más fermentables. Medias con diferente letra entre tratamientos implican diferencia significativa (Tukey, $\alpha=0.05$).

Tabla 4. Contenido de carbohidratos fermentables (g 100 mL⁻¹) en mostos a diferentes niveles de sólidos solubles (°P) generados de un mosto concentrado (20 °P) obtenido de una maceración isotérmica a 65 °C por 3 h y relación malta:agua 1:3 (experimento 4).

Table 4. Fermentable carbohydrates content (g 100 mL⁻¹), in worts with different levels of soluble solids (°P) adjusted from a concentrated wort (20 °P), obtained with an isothermal mashing at 65 °C for 3 h and a 1:3 grist:water ratio (experiment 4).

| Tratamiento* | Glucosa | Fructosa | Maltosa | Maltotriosa | CF** | CF+*** |
|--------------|---------|----------|---------|-------------|----------|---------|
| 10.00 | 1.15a | 0.21b | 5.91d | 1.48d | 8.75c | 7.28c |
| 11.25 | 1.49b | 0.32ab | 6.70cd | 1.65cd | 10.17bc | 8.52bc |
| 12.50 | 1.35b | 0.25ab | 7.01bcd | 1.76bcd | 10.36bc | 8.61bc |
| 13.75 | 1.60bc | 0.37ab | 7.70bcd | 1.92abcd | 11.59abc | 9.67abc |
| 15.00 | 1.64c | 0.31ab | 8.37abc | 2.13abc | 12.44ab | 10.31ab |
| 16.25 | 1.90cd | 0.39a | 8.77ab | 2.20ab | 13.26ab | 11.06ab |
| 17.50 | 1.91d | 0.34ab | 9.70a | 2.39a | 14.34a | 11.95a |

*Sólidos solubles en °P **C.F.=Carbohidratos fermentables totales. ***Carbohidratos más fermentables. Medias con diferente letra entre tratamientos implican diferencia significativa (Tukey, $\alpha=0.05$).

tamaño de partícula durante la molienda de malta, además de la reducción del contenido de sólidos solubles en mosto, disminuye la fermentabilidad de mostos y contenido de alcohol en mosto fermentado (Evans *et al.*, 2011); parámetros altamente asociados a CF y CF+/CF (Cutaia, 2007).

Como consecuencia del incremento en los sólidos solubles, los mostos fermentados del experimento 4 mostraron aumento gradual del contenido de etanol (Tabla 5). No obstante, al considerar el parámetro 'rendimiento de etanol', se observó que los mejores tratamientos fueron 12.5 °P y 15.0 °P, superiores al resto de los tratamientos en promedio 0.02 g etanol/g sólidos solubles; lo cual, haciendo los cálculos respectivos, equivale a ~20 L de etanol puro por tonelada de malta. Por otro lado, la menor generación de metanol ocurrió con los tratamientos 10.0 °P y 12.5 °P; mismos que mostraron reducidos niveles de glicerol. La presencia de metanol es una característica indeseable en bebidas alcohólicas debido a su toxicidad, por lo que diferentes países establecen límites máximos respecto a este compuesto tanto en bebidas fermentadas como destiladas (Ohimain, 2016). A pesar de que la mayor parte del metanol se elimina en las etapas iniciales de la destilación como parte de los *foreshots* o 'cabezas', bajas concentraciones de este compuesto contribuyen a la mejor recuperación de etanol en las fracciones intermedias del destilado (Lyons, 2003; Nicol, 2014; Kwak *et al.*, 2015).

Respecto al glicerol, se observó incremento significativo en mostos fermentados a medida que la cantidad inicial de sólidos solubles fue mayor. El incremento de glicerol durante la fermentación de soluciones con mayor presión osmótica (i.e. >°P), es una respuesta de la levadura que genera y acumula este compuesto para incrementar su tolerancia a dichas condiciones de estrés (Nevoigt y Stahl, 1997; Cronwright *et al.*, 2002). A pesar de que el glicerol es deseable hasta cierto punto en bebidas fermentadas como la cerveza y el vino dado su efecto positivo en palatabilidad y percepción de sabor, en la producción de whisky constituye una desventaja por dos razones principales: 1) su punto de ebullición es de 290 °C, por lo que no es un compuesto presente en esta bebida (Ayllott, 2014); y 2) su biosíntesis (al igual que la de etanol) se lleva a cabo a partir de glucosa, resultando una relación inversa entre ambos compuestos (Scanes *et al.*, 1998; Aslankoohi *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). Además del glicerol, se ha reportado la variación de otros compuestos (tanto deseables como no deseables) generados en fermentaciones con alto contenido de sólidos solubles (Younis y Stewart, 1999); comúnmente denominadas fermentaciones de alta gravedad, por implicar alta gravedad específica de los mostos a fermentar (i.e. gravedad específica a 20 °C ≥ 1.061 , equivalente a ≥ 15 °P). El uso de fermentaciones de alta gravedad en cervecería, a pesar de inconvenientes observados en la reducción de la estabilidad

Tabla 5. Características de mostos de malta de cebada fermentados a 20 °C (168 h) con diferentes niveles de sólidos solubles (°P) iniciales.

Table 5. Characteristics of malt worts fermented at 20 °C (168 h) with different levels of initial soluble solids (°P).

| °P | Etanol (%v/v) | Etanol _r (g/g) ¹ | Metanol (%v/v) | G _{OH} (g L ⁻¹) ² | M3 _E (%) ³ | CF _E (%) ⁴ |
|-------|---------------|--|----------------|---|----------------------------------|----------------------------------|
| 10.00 | 4.23d | 0.32b | 0.02b | 2.02d | 58.89b | 90.05a |
| 11.25 | 4.74d | 0.32b | 0.07c | 2.66bc | 62.95ab | 91.06c |
| 12.50 | 5.71c | 0.34c | 0.02b | 2.55c | 64.68ab | 91.94bc |
| 13.75 | 6.14bc | 0.33bc | 0.07c | 3.06ab | 70.62ab | 93.03b |
| 15.00 | 6.89ab | 0.34c | 0.05c | 2.86abc | 70.33ab | 93.16b |
| 16.25 | 7.06ab | 0.32b | 0.05c | 3.30a | 76.94a | 93.49b |
| 17.50 | 7.13a | 0.30a | 0.17a | 3.13a | 71.11ab | 92.92b |

¹Rendimiento de etanol (g etanol/g sólidos solubles); ²Glicerol; ³Fermentabilidad de maltotriosa (% inicial-final); ⁴Fermentabilidad de carbohidratos fermentables totales (% inicial-final). Medias con diferente letra entre tratamientos implican diferencia significativa (Tukey, $\alpha=0.05$).

de espuma asociada al incremento de la Proteinasa A, ha resultado benéfica respecto a maximizar el uso de espacio en plantas cerveceras y, en consecuencia, el incremento en la capacidad de producción. No obstante, en fermentaciones a >20 °P para whisky de grano, se ha observado que el patrón fermentativo de la levadura cambia considerablemente al incrementar el contenido de maltosa y maltotriosa residuales en mostos fermentados; lo que genera bajo contenido de etanol (Stewart, 2009; Stewart, 2010). En este estudio, a pesar de la reducción significativa del rendimiento de etanol a 17.5 °P, no se observó variación respecto a la fermentabilidad de carbohidratos fermentables entre tratamientos; lo que sugiere que la levadura, previo a modificar su patrón de consumo de carbohidratos, reduciría inicialmente la síntesis de etanol. Considerando los resultados observados en el experimento 4, se concluye que la mejor concentración de sólidos solubles para el incremento de etanol en fermentaciones de whisky de malta es 12.5 °P.

En el experimento 5 se utilizaron mostos de 12.5 °P, por lo que no se observó diferencia estadística en cada uno de los mostos obtenidos por separado a este nivel de sólidos solubles respecto a CF y CF+, cuyos valores promedio generales fueron 10.05 y 8.37 g 100 mL⁻¹, respectivamente. Asimismo, tanto los valores de maltosa como la relación CF+/CF fueron similares a lo observado en el experimento 4 con los mostos a 12.5 °P. Los resultados de este experimento señalan que, en términos de rendimiento de etanol, la mejor temperatura de fermentación de las tres evaluadas en el Factor A, a través de los tratamientos del Factor B, es 20 °C (Tabla 6). Este resultado confirma la importancia del control de temperaturas en la producción de whisky, ya que -a diferencia de las fermentaciones cerveceras- las fermentaciones en destilería son generalmente menos estrictas (Russell y Stewart, 2014). Por otro lado, la fermentación cerrada, a través de los tratamientos del factor A, mostró mayor rendimiento de etanol que la fermentación abierta; lo cual es atribuible a las características de fermentación de la levadura debido a que, a pesar de que este microorganismo optará por la ruta anaeróbica considerando el nivel de sólidos solubles presentes, la presencia de oxígeno contribuye al incremento del número de células en suspensión; lo cual ocurre a expensas de CF (Rosenfeld *et al.*, 2003; Cutaia, 2007). Además, al analizar

las condiciones de fermentación a 20 °C se observó que en fermentación abierta se incrementa en 14 % el glicerol y disminuye el rendimiento de etanol en 0.01 g etanol/g sólidos solubles (equivalente a ~10 L de etanol puro por tonelada de malta) respecto a la fermentación cerrada. A pesar de que actualmente en cervecería es difícil encontrar fermentaciones abiertas, en la producción de destilados como el whisky aún se utilizan fermentadores abiertos; aunque en décadas recientes su uso ha disminuido gradualmente para dar paso a los fermentadores de acero inoxidable. No obstante, este cambio más bien se ha dado con el objetivo de disminuir la contaminación bacteriana y de levaduras salvajes; cuyos metabolitos causan efectos negativos en el perfil de sabor de destilados (Wilson, 2014).

CONCLUSIONES

Las variaciones en las condiciones de maceración afectan significativamente el contenido de CF en mosto. Se determinó que la maceración a 65 °C durante 3 h con relación malta:agua 1:3 resulta en la generación de mostos con mayor contenido de CF, principalmente los tres más fermentables (i.e. fructosa, glucosa, maltosa); por lo que bajo estas condiciones mejoró sustancialmente la relación CF+/CF. El mejor rendimiento de etanol (0.34 g etanol/g sólidos solubles) durante la fermentación de estos mostos se obtuvo en fermentaciones cerradas a 12.5 °P y 20 °C. Se observó que las fermentaciones de alta gravedad (>15 °P) resultan en el incremento de glicerol y reducción en el rendimiento de etanol.

REFERENCIAS

- Agu, R.C., Bringham, T.A., and Brosnan, J.M. 2006. Production of grain whisky and ethanol from wheat, maize and other Cereals. *Journal of the Institute of Brewing* 112(4): 314-323.
- American Malting Barley Association, Inc. (AMBA). Malting barley breeding guidelines, ideal commercial malt criteria. [Consultado el 4 de septiembre de 2021]. Disponible en: https://ambainc.org/wp-content/uploads/2021/07/Malting-Barley-Breeding-Guidelines_2021_Jun_e.pdf.
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). 2009. *Methods of Analysis*, 8th Ed. Malt-3 Moisture, -4 Extract, -6A Diastatic power, -7A Alpha-amylase, -8A Protein (Nx6.25) by Kjeldahl, -12 Malt modification by friability; Wort-2B Specific gravity

Tabla 6. Características de mostos de malta de cebada fermentados a 12.5 °P, tres diferentes temperaturas (Factor A) y dos condiciones de fermentación (Factor B).

Table 6. Characteristics of malt worts fermented at 12.5 °P, three different temperatures (Factor A), and two fermentation conditions (Factor B).

| Factor ¹ | Nivel ² | Etanol (%v/v) | Etanol _r (g/g) ³ | Metanol (%v/v) | G _{OH} (g L ⁻¹) ⁴ | M ₃ (%) ⁵ | CF _F (%) ⁶ |
|---------------------|--------------------|---------------|--|----------------|---|---------------------------------|----------------------------------|
| A | 1 | 5.58a | 0.34a | 0.04a | 2.73ab | 63.33b | 91.78b |
| | 2 | 4.41b | 0.27b | 0.07a | 2.52a | 81.39a | 95.28a |
| | 3 | 4.75ab | 0.29ab | 0.11a | 3.02b | 68.84ab | 93.37ab |
| B | 1 | 4.55a | 0.27a | 0.08a | 2.79a | 70.16a | 93.22a |
| | 2 | 5.27b | 0.32b | 0.07a | 2.72a | 72.21a | 93.73a |

¹Factor A, temperaturas de fermentación, 1= 20 °C, 2= 25 °C, 3= 30 °C; ²Factor B, condiciones de fermentación, 1=abierta (no *airlock*), 2=cerrada; ³Rendimiento de etanol (g etanol/g sólidos solubles); ⁴Glicerol; ⁵Fermentabilidad de maltotriosa (% inicial-final); ⁶Fermentabilidad de carbohidratos fermentables totales (% inicial-final). Medias con diferente letra entre tratamientos implican diferencia significativa (Tukey, $\alpha=0.05$).

- by digital density meter, -9B Preparation of wort for color determination, -12 Free amino nitrogen, -13 viscosity, -14B Fermentable saccharides by High performance liquid chromatography, -17 Protein in unhopped wort by spectrophotometry. The Society, St. Paul, MN.
- Aslankooi, E., Rezaei, M.N., Vervoort, Y., Courtin, C.M., and Verstrepen, K.J. 2015. Glycerol production by fermenting yeast cells is essential for optimal bread dough fermentation. *PLoS ONE* 10(3): e0119364. DOI 10.1371/journal.pone.0119364
- Aylott, R. 2014. Whisky analysis. En: *Whisky: Technology, production and marketing*, 2nd. Edition. I. Russell y G. Stewart (ed.), pp 243-270. Academic Press, UK.
- Bathgate, G.N. 2016. A review of malting and malt processing for whisky distillation. *Journal of the Institute of Brewing* 122: 197-211.
- Bringhurst, T.A. y Brosnan, J. 2014. Scotch whisky: Raw material selection and processing. En: *Whisky: Technology, production and marketing*, 2nd. Edition. I. Russell y G. Stewart (ed.), pp 49-122. Academic Press, UK.
- Cronwright, G.R., Rohwer, J.M., and Prior, B.A. 2002. Metabolic Control Analysis of Glycerol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9): 4448-4456.
- Cutaia, A.J. 2007. Estimation of yeast mass increase in production brewing fermentations by calculation of carbohydrate utilization. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 65(3): 166-171.
- Evans, E.D., Collins, H., Eglinton, J., and Wilhelmson, A. 2005. Assessing the impact of the level of diastatic power enzymes and their thermostability on the hydrolysis of starch during wort production to predict malt fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 63(4): 185-198.
- Evans, E.D., and Fox, G.P. 2017. Comparison of diastatic power enzyme release and persistence during modified Institute of Brewing 65°C and Congress programmed mashes. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 75(4): 302-311.
- Evans, E.D., Goldsmith, M., Damberg, R., and Nischwitz, R. 2011. A comprehensive reevaluation of small-scale Congress Mash protocol parameters for determining extract and fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 69(1): 13-27.
- Evans, E.D., Goldsmith, M., Redd, K.S., Nischwitz, R., and Lentini, A. 2012. Impact of mashing conditions on extract, its fermentability, and the levels of wort free amino nitrogen (FAN), β -Glucan, and Lipids. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 70(1): 39-49.
- Evans, E.D., Li, C., and Eglinton, J.K. 2010. The properties and genetics of barley malt starch degrading enzymes. En: *Genetics and improvement of barley malt quality*. G. Zhang y C. Li (ed.), pp 143-189. Zhejiang University Press, Hangzhou, China.
- Fukuyo, S., and Myojo, Y. 2014. Japanese whisky. En: *Whisky: Technology, production and marketing*, 2nd. Edition. I. Russell y G. Stewart (ed.), pp 17-26. Academic Press, UK.
- Gibson, T.S., Solah, V., Glennie Holmes, M.R., and Taylor, H.R. 1995. Diastatic power in malted barley: Contributions of malt parameters to its development and the potential of barley grain beta-amylase to predict malt diastatic power. *Journal of the Institute of Brewing* 101:277-280.
- Henson, C.A., Duke, S.H., and Vinje, M.A. 2014. A comparison of barley malt amyolytic enzyme thermostabilities and wort sugars produced during mashing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 72(1): 51-65.
- Hill, A., and Stewart, G.G. 2019. Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation* 5,22; doi:10.3390/fermentation5010022
- Huerta, Z.R., Zamora, D.M., Solano, H.S., y López, C.M.L. 2014. Friabilidad de malta y predicción de calidad en el mejoramiento genético de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(4): 577-590.
- Jin, Y.-L., Speers, R.A., and Paulson, A.T. 2004. Effect of β -glucans and process conditions on the membrane filtration performance of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 62(3): 117-124.
- Kwak, H.S., Seo, J.S., Hur, Y., Shim, H.-S., Lee, Y., Kim, M., and Jeong, Y. 2015. Influence of yeast strains on the physicochemical characteristics, methanol and acetaldehyde profiles and volatile compounds for Korean rice distilled spirit. *Journal of the Institute of Brewing* 121: 574-580.
- Li, H., Han, X., Liu, F., Kun-Farkas, G., and Kiss, Z. 2015. Simple HPLC method for determining the glycerol content of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 73(4): 314-317.
- Lyons, T.P. 2003. Production of Scotch and Irish whiskies: their history and evolution. En: *The alcohol textbook*, 4th. Edition. K.A. Jacques, T.P. Lyons, y D.R. Kelsall (ed.), pp 194-222. Nottingham University Press, UK.
- Lyons, T.P. 2014. North American whiskies: A story of evolution, experience, and an ongoing entrepreneurial spirit. En: *Whisky: Technology, production and marketing*, 2nd. Edition. I. Russell y G. Stewart (ed.), pp 39-48. Academic Press, UK.
- Miedl, M., García, M.A., and Bamforth, C.W. 2005. Haze formation in model beer systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(26): 10161-10165.
- Muller, R. 1991. The effects of mashing temperature and mash thickness on wort carbohydrate composition. *Journal of the Institute of Brewing* 97:85-92.
- Muralikrishna, G., and Nirmala, M. 2005. Cereal α -amylases - an overview. *Carbohydrate Polymers* 60: 163-173.
- Nevoigt, E., and Stahl, U. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 231-241.
- Nicol, D.A. 2014. Batch distillation. En: *Whisky: Technology, production and marketing*, 2nd. Edition. I. Russell y G. Stewart (ed.), pp 155-178. Academic Press, UK.
- Ohimain, E.I. 2016. Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. *SpringerPlus* 5:1607. DOI 10.1186/s40064-016-3303-1
- Qi, J.C., Zhang, G.P. y Zhou, M.X. 2006. Protein and hordein content in barley seeds as affected by nitrogen level and their relationship to beta-amylase activity. *Journal of Cereal Science* 43: 102-107.
- Quinn, D. 2014. Irish whiskey. En: *Whisky: Technology, production and marketing*, 2nd. Edition. I. Russell y G. Stewart (ed.), pp 7-16. Academic Press, UK.
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., and Salmon, J.-M. 2003. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: Effect on fermentation kinetics. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1): 113-121.

- Russell, I., and Stewart, G. 2014. Distilling yeast and fermentation. En: *Whisky: Technology, production and marketing*, 2nd. Edition. I. Russell y G. Stewart (ed.), pp 123-146. Academic Press, UK.
- Sadosky, P., Schwarz, P.B., and Horsley, R. 2002. Effect of arabinoxylans, β -glucans, and dextrans on the viscosity and membrane filterability of a beer model solution. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 60(4): 153-162.
- Scanes, K.T., Hohmann, S., and Priori, B.A. 1998. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 19(1): 17-24.
- Schwarz, P.B., Li, Y., Barr, J., y Horsley, R.D. 2007. Effect of operational parameters on the determination of laboratory extract and associated wort quality factors. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 65(4): 219-228.
- Statistical Analysis System (SAS). 2011. SAS Software. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Stenholm, K., and Home, S. 1999. A new approach to limit dextrinase and its role in mashing. *Journal of the Institute of Brewing* 105(4): 205-210.
- Stewart, G.G. 2009. The Horace Brown medal lecture: forty years of brewing research. *Journal of the Institute of Brewing* 115(1): 3-29.
- Stewart, G.G. 2010. High-gravity brewing and distilling - Past experiences and future prospects. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 68(1): 1-9.
- Stewart, G.G., Hill, A.E., and Russell, I. 2013. 125th Anniversary review: Developments in brewing and distilling yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing* 119: 202-220.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., and Derdelinckx, G. 2006. The chemistry of beer aging - A critical review. *Food Chemistry* 95: 357-381.
- Wei, K., Dai, F., Wu, F. y Zhang, G. 2009. The variation of β -amylase activity and protein fractions in barley grains as affected by genotypes and post-anthesis temperatures. *Journal of the Institute of Brewing* 115(3): 208-213.
- Willaert, R. 2007. The beer brewing process: Wort production and beer fermentation. En: *Handbook of food products manufacturing*. Y.H. Hui (ed.), pp 443-506. John Wiley & Sons, NJ.
- Wilson, N. 2014. Contamination: Bacteria and wild yeasts in a whisky fermentation. En: *Whisky: Technology, production and marketing*, 2nd. Edition. I. Russell y G. Stewart (ed.), pp 147-154. Academic Press, UK.
- Younis, O.S., and Stewart, G.G. 1999. Effect of malt wort, very-high-gravity malt wort, and very-high-gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57(2): 39-45.

Isolation and characterization of one autochthonous *Beauveria* sp. isolate from Cuban fields

Aislamiento y caracterización de un aislado autóctono de *Beauveria* sp. de los campos cubanos

Machín Suárez A¹, del Pozo Núñez EM¹, García Cruz I¹, Héctor Ardisana EF², Domínguez Y³, Guerrero-Morales S⁴, Chávez Medina JA⁵, Escobedo Bonilla CM⁵, Pérez-Álvarez S^{4*}

¹ Universidad Agraria de la Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez", Departamento Biología y Sanidad Vegetal. Carretera Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, C. P.32700, Cuba.

² Instituto de Posgrado, Universidad Técnica de Manabí. Portoviejo, Ecuador, CP EC13010.

³ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Câmpus São Vicente, Praça Infante Dom Henrique s/n, Parque Bitaru, São Vicente, SP, Brasil, CEP 11380-972.

⁴ Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, Universidad Autónoma de Chihuahua. Km 2.5, carretera Delicias-Rosales, campus Delicias, CD. Delicias, Chihuahua, México, CP 33000.

⁵ Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Sinaloa. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes 250, CP 81101 Guasave, Sinaloa, México.

SUMMARY

The genus *Beauveria* comprises a cosmopolitan teleomorphic and anamorphic group of entomopathogenic fungi. The aim of this study was to characterize a new isolate of *Beauveria* sp. and compare it to the LBB-1 commercial Cuban strain. The isolate was collected from ten individuals of the ant *Atta insularis* and ten adults of the coffee borer (*Hypotenemus hampei*). It was cultivated on solid SDAY medium enriched with 1% yeast extract. The biological effectiveness of the isolate was determined on *C. formicarius*. DNA was isolated using the CTAB method and the internal transcribed spacer region was amplified using the primers ITS1 and ITS 4. The consensus sequence obtained was deposited in GenBank (MK246940) and used for phylogenetic analysis. The isolate of *Beauveria* sp. showed differences in morphological characteristics; however, it showed low genetic variability regarding worldwide isolates of *B. bassiana*. Concerning its biological effectiveness, the isolate demonstrated to be virulent on the phytophagous adults, producing 50% mortality. Four clades were identified and the polytomous topology recovered for clade 1 indicates high genetic similarity (99-96%) with *Beauveria bassiana* from several countries. The morphological and molecular characterization made it possible to accurately identify the new isolate as *Beauveria bassiana*.

Key words: Autochthonous isolate, entomopathogen, enzymatic activity, morphology, pest control

RESUMEN

El género *Beauveria* comprende un grupo cosmopolita teleomórfico y anamórfico de hongos entomopatógenos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar un nuevo aislado de *Beauveria* sp. en comparación con la cepa comercial cubana LBB-1. El aislamiento se obtuvo de diez individuos de *Atta insularis* y diez adultos del barrenador del café (*Hypotenemus hampei*), respectivamente. Se cultivó en medio sólido SDAY enriquecido con 1% de extracto de

levadura. Se determinó la eficacia biológica del aislado sobre *C. formicarius*. El ADN se aisló usando el método CTAB y se amplificó la región de espaciador interno transcrito usando los cebadores ITS1 e ITS4. La secuencia consenso obtenida se depositó en GenBank (MK246940) y se utilizó para análisis filogenético. El aislado de *Beauveria* sp. mostró diferencias en sus características morfológicas; sin embargo, mostró una baja variabilidad genética con respecto a los aislamientos mundiales de *B. bassiana*. En cuanto a su eficacia biológica, el aislado demostró ser virulento sobre los adultos fitófagos, alcanzando el 50% de mortalidad. Se identificaron cuatro clados y la topología politómica recuperada para el clado 1 indica una alta similitud genética (99-96%) con *Beauveria bassiana* de varios países. La caracterización morfológica y molecular permitió identificar con precisión la especie del nuevo aislado.

Palabras clave: aislado autóctono, entomopatógeno, actividad enzimática, morfología, control de plagas

INTRODUCTION

The chemical control of agricultural pests has been the foremost used method in the last 70 years. During this time, enough evidence has been accumulated on the risks posed by the use of chemical pesticides, both on the environment and human health, and they also compromise the sustainability of agricultural systems. This situation has generated global concern, and has increased claims that the use of chemical pesticides should be reduced in favor of an integrated pest management (IPM) (Bueno *et al.*, 2017). The alternative to chemical control is the application of biological control. This constitutes an environmentally safe method and it is proposed as a component of the IPM. This approach has gained momentum as a strategy to replace the chemical pesticides. In recent years, an increased interest has emerged to use entomopathogenic fungi as biological control, having reached a significant advance in the development and manufacture of these agents (Swiergiel *et al.*, 2016).

*Autor para correspondencia: Sandra Pérez Álvarez
 Correo electrónico: spalvarez@uach.mx

Recibido: 17 de agosto de 2021

Aceptado: 11 de enero de 2022

Several entomopathogenic fungi species, especially *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., have a wide host range, such as Coleoptera, Lepidoptera and Diptera. According to Humber (2012), this fungal species is filamentous, has chitinized cells, belongs to the class Ascomycetes, and like other entomopathogenic fungi, it is heterotrophic. *B. bassiana* parasites insects of great economic importance, due to its physical (action of pressure on the contact surface) and chemical (action of enzymes: proteases, lipases and chitinases) mechanisms of infection (Humber, 2012; Dhawan and Joshi, 2017). The usefulness of this microorganism in the biological control of insects has prompted its inclusion in several IPM programs.

Beauveria bassiana, like many other entomopathogenic fungi, shows a wide intraspecific variability. This feature allows its manipulation to obtain environmentally safe strains, characterization and their use to produce biopreparations. Basic taxonomy, ecology, behavior, population dynamics, population genetics and modelling research studies are needed to improve the procedures used in biological control agent exploration (Barrat *et al.*, 2018).

At present, little is known about the molecular characterization of *B. bassiana* and most of the studies are based on molecular markers (Dhar *et al.*, 2019; Vargas-Martinez *et al.*, 2019). Studies on the molecular features of this entomopathogenic species may help to determine its taxonomic, phylogenetic and biological properties.

Taking together all the above-mentioned elements, the aim of this research was to characterize by morphological, enzymatic, pathogenic and molecular means, an autochthonous *Beauveria* sp. Cuban isolate and compare it to the LBB-1 commercial Cuban strain.

MATERIALS AND METHODS

The *Beauveria* sp. isolate was collected in the province of Mayabeque, Cuba, from *Atta insularis* (Güerin) (Hymenoptera: Formicidae) and adults of the coffee borer (*Hypotenemus hampei* (Ferrari)) (Coleoptera: Scolytidae). The *Beauveria* sp. isolate and the LBB-1 strain were cultivated in the Sabouraud Dextrose Agar medium enriched with 1% of yeast extract (SDAY). The LBB-1 strain was provided by the Entomophagous and Entomopathogenic Reproduction Center, and it is conserved in the Phytopathology Laboratory of the Agronomy Faculty at the Agrarian University of Havana "Fructuoso Rodríguez Pérez".

Morphological characterization

The macroscopic characterization of the entomopathogenic fungi was done with 5 mm discs from the periphery of pure colonies cultivated in Petri dishes (90 mm) with SDAY medium. Cultures were incubated in the dark at 25 °C. After 72 hours, appearance and colony color before and during sporulation, and characteristics of the reverse side of the colony were evaluated visually. Daily growth rate and production of conidia were determined (Martins *et al.*, 2015).

The microscopic characterization was carried out from microcultures on slides covered with a thin layer of water Agar (WA), and incubated in a humid chamber for 72 hours in a Boxum incubator at 25 °C in the dark. Subsequently, the morphology and disposition of the conidiogenic cells and the shape of the conidia were determined per isolate with an NLCD-307 (40X) microscope with Software-NMS designed for the Windows CE5.0 system. The macroscopic and microscopic characteristics obtained from the studied isolate were compared to those of the LBB-1 strain of *B. bassiana*, using the same procedure.

Spores were counted using a Neubauer's chamber in a NLCD-307 (40X) microscope with Software-NMS designed for Windows CE5.0 system, expressing the results in conidia mL⁻¹. The original data were transformed to their logarithms and then processed using a simple classification variance analysis, comparing the means through the Tukey test ($p < 0.05$) (SAS Institute, 2016).

Enzymatic characterization

Enzyme activities were determined using 5 mm discs from the periphery of pure colonies obtained in Petri dishes (90 mm) with SDAY medium; the discs were cultivated in specific culture medium for the activity of each enzyme. The medium used for proteases determination was 0.5% peptone, 0.5% NaCl, 0.25% casein, and 0.05% CaCl₂ hydrated. In this medium, the hydrolysis halo formed by the degradation of the protein was measured. For the determination of lipase activity, a SDAY culture medium enriched with 5.0% butter was used and the opacity halo around the colony was measured. The determinations of lipase enzyme activity were done at 2, 4 and 6 days and protease at 3, 5 and 7 days. In the determination of the enzymatic activities of the fungi, a completely randomized design (three repetitions/treatment) was used. The data were transformed to $\sqrt{(x+1)}$ and were processed through variance bifactorial analysis (isolates x time), comparing the means through the Tukey test ($p < 0.05$) (SAS Institute, 2016).

Pathogenic characterization

The biological effectiveness of the *Beauveria* sp. isolate and strain LBB-1 of *B. bassiana* on *Cylas formicarius* Fabricius was evaluated under laboratory conditions. Adult insects were collected in sweet potato fields (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) without biological or chemical treatments. They were immersed for one minute into a conidial suspension with Tween 80 (0.01%) at 107 conidia mL⁻¹ from each isolate, and then transferred into jars with a diet based on 10 g of fresh sweet potato roots (Hua *et al.*, 2021). After day 3 or 4 post-inoculation, the dead insects were collected daily until the growth of the fungus appeared on the body surface. The mortality data was obtained at seven days through direct observation method.

The experimental design was completely randomized; 30 insects were used for each isolate and 30 as a control (not immersed into the conidial suspension) distributed in three

replicates with 10 insects each. The data were transformed to $\arcsin(p)^{1/2}$ and then processed by simple classification analysis of variance, comparing the means through the Tukey test ($p < 0.05$) (SAS Institute, 2016).

Molecular characterization

DNA extraction was done using the mycelium of each fungus, according to the method proposed by Polanco *et al.* (2019). The obtained DNA was visualized in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and stored at -20°C for further use. Amplification of the internal transcribed spacer region (700–1050 bp) was performed using the ITS-1 (GGAAGTA-AAAGTCGTAACAAGG) / ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) primer pair (White *et al.*, 1990). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a thermocycler (BioRad, CA, USA) and the amplification program comprised one cycle at 95°C , 4 min, 30 cycles at 95°C , 1 min, 60°C , 1 min and 72°C by 2 min, with a final extension cycle at 72°C for 5 min. The amplified fragments were visualized by 1% agarose gel electrophoresis. The PCR product was purified with a Wizard SV Gel Kit and PCR Clean-Up System (Promega) and sequenced at the Chemistry DNA laboratory in CINVESTAV-IPN Unit Irapuato using a kit Dye Terminator Cycle Sequencing, Ready Reaction, in an ABI PRISM 377 PERKIN-ELMER (Cetus, Norwalk, CT) sequencer. Forward and reverse sequences were examined and aligned in BioEdit (Hall, 1999) and ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) respectively, in order to obtain a consensus sequence for further analyses.

The ITS sequence obtained and submitted to GenBank (MK246940) was compared with selected sequences of *B. bassiana* from different locations worldwide available at GenBank® database (Benson *et al.*, 2013). *Metharhizium rileyi* (Farlow) Kepler, (MG637450) and *Pochonia sp.* (DQ516081) were used as outgroup. Sequences were aligned with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) and BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999) and the final matrix containing 560 nucleotide positions was used for a phylogenetic analysis through Bayesian inference performed in MrBayes 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012). The analysis was carried out with two independent runs of four Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MC)³ (Altekar *et al.*, 2004) for a total of 3×10^6 generations, sampling one every 100 trees and discarding the first 25% of the trees as burn-in. Posterior probabilities were assessed from the 50% majority rule consensus and the tree was edited in FigTree 1.4.3 (Rambaut, 2016).

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological characteristics

The *Beauveria sp.* isolate and LBB-1 strain macroscopic characteristics are shown in figures 1 and 2. The observed characteristics are very similar to those reported by Samson *et al.* (1988) and Humber (2012).

The colonies of *Beauveria sp.* isolate have regular edges, with white color, velvety, they form striate that do not cover the whole colony, they are elevated (synnemata formation). At the beginning of sporulation, colonies acquire

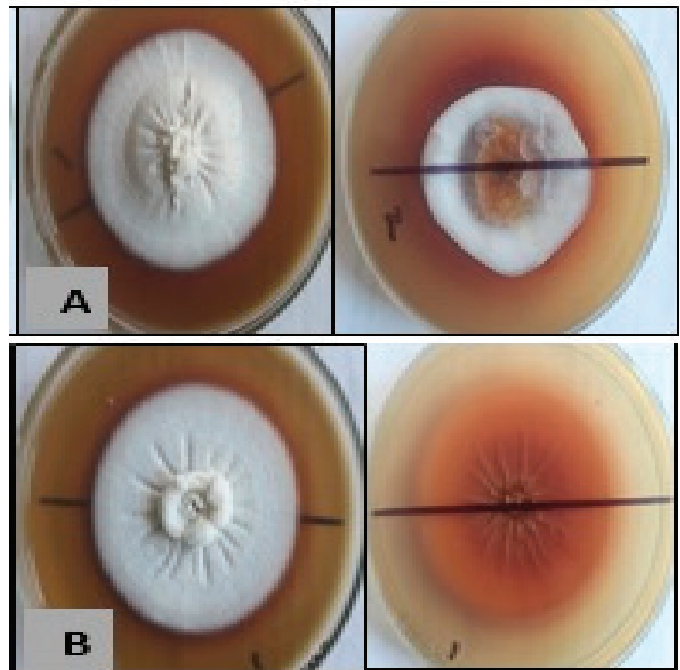


Figure 1. Colonies of the *Beauveria sp.* isolate and the commercial strain after 15 days of inoculation in culture medium. A: *Beauveria sp.* isolate; B: LBB-1 strain (Photo: NLCD-307 microscope (40X) with Software-NMS designed for the Windows CE5.0 system).

Figura 1. Colonias del aislado de *Beauveria sp.* y de la cepa comercial después de 15 días de su inoculación en medio de cultivo. A: Aislado de *Beauveria sp.*; Cepa LBB-1 (Foto: Microscopio NSZ-808 con Software-NMS diseñado para el sistema Windows CE5.0).

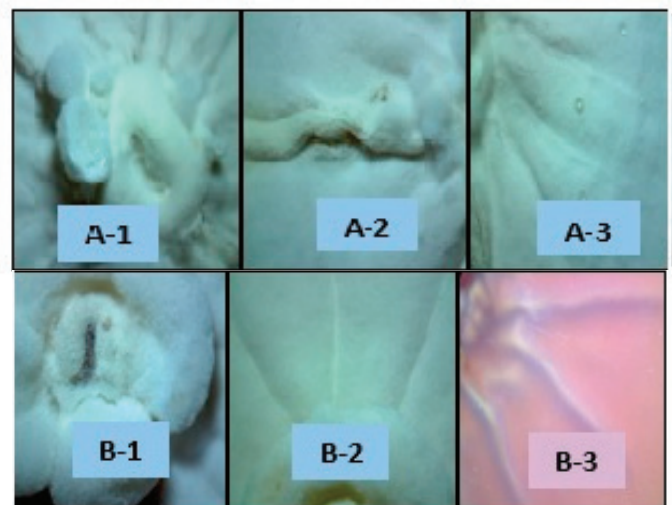


Figure 2. Colony images. A-1: Synnemata in *Beauveria sp.* isolate; A-2 and A-3: Stretch marks in *Beauveria sp.* isolate; B-1: Synnemata in LBB-1 strain; B-2: Stretch marks in LBB-1 strain; B-3: Color and stretch marks in the reverse of LBB-1 strain colonies (Photo: NLCD-307 microscope (40X) with Software-NMS designed for the Windows CE5.0 system).

Figura 2. Imagen de las colonias. A-1: Sinemas en el aislado de *Beauveria sp.*; A-2 y A-3: Estrías en el aislado de *Beauveria sp.*; B-1: Sinemas en la cepa LBB-1; B-2: Estrías en la cepa LBB-1; B-3: Coloración y estrías del reverso de la colonia de la cepa LBB-1 (Foto: Microscopio NSZ-808 con Software-NMS diseñado para el sistema Windows CE5.0).

a yellowish coloration, on the reverse side they are red but there comes a time when the medium is broken and the mycelium grows below (Figure 2 A-1 to A-3).

The LBB-1 strain used in the Entomophagous and Entomopathogenic Reproduction Centers of Mayabeque Cuban province for the production of biological media, showed the following characteristics: white colonies with powdery appearance, regular edges, elevated in the center (synnema formation), although this strain rarely forms them, striated, and they acquire a creamy coloration at the beginning of sporulation; on the reverse they are red, and stretch marks do not cover the entire colony (Figure 2 B-1 to B-3).

This *Beauveria* sp. Cuban isolate showed a slow growth (Afifah and Saputro, 2020). Other observed morphological characteristics of the isolate are very similar to those reported by Samson *et al.* (1988) and Humber (2012), thus confirming that the isolate belongs to *B. bassiana*. Gebremariam *et al.* (2021) found that all of *B. bassiana* isolates showed disseminated growth patterns, with white to yellowish-white colony color, smooth powdery to cottony texture, raise to flat elevation, and round shape, some of these characteristics are different to those reported in the isolate from the present study.

The colonies daily growth under a temperature of 25 °C showed a uniform rate (Figure 3). The colonies of the *Beauveria* sp. isolate grew well at the experimental conditions. The temperature conditions can be considered favorable for mycelial growth within the range of 20 to 30 °C. According to Gebremariam *et al.* (2021), Qiu *et al.* (2019) and Chen *et al.* (2018), the optimal temperature ranges for the development of pathogenic effect and survival of *B. bassiana* and other

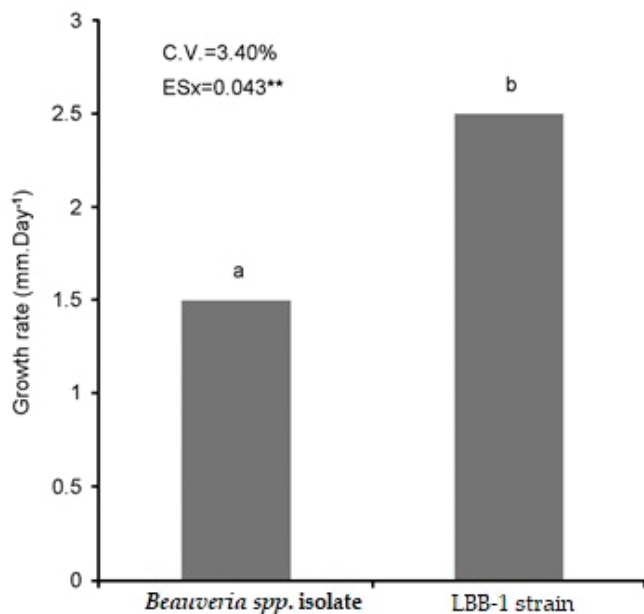


Figure 3. Growth rate of *Beauveria* sp. isolate and *B. bassiana* LBB-1 strain at 25 °C after 15 days (mm day⁻¹). Means with different letters are significantly different according to Tukey ($p \leq 0.05$).

Figura 3. Tasa de crecimiento del aislado de *Beauveria* sp. y la cepa LBB-1 de *B. bassiana* a 25 °C después de 15 días (mm día⁻¹). Medias con letras diferentes son significativamente diferentes según Tukey ($p \leq 0.05$).

entomopathogenic fungi fluctuates around 25 °C. According to Yu *et al.* (2020) for a better practical application of fungi in agriculture a higher thermotolerance of entomopathogenic fungi is essential.

The production of conidia by the *Beauveria* sp. isolate and the LBB-1 commercial strain is shown in Table 1. The *Beauveria* sp. autochthonous isolate produced more conidia than the commercial LBB-1 strain, which means that the infection of this isolate will be greater since conidia represents infectious units necessary for the production of a biopesticide.

Table 1. Conidia production by *Beauveria* sp. isolate and the *B. bassiana* LBB-1 strain at 25 °C.

Tabla 1. Producción de conidios por el aislado de *Beauveria* sp. y la cepa LBB-1 de *B. bassiana* a 25 °C.

| Isolates | Conidia production (conidia mL ⁻¹) | |
|----------------------|--|---------------------|
| | X orig. | X transf. |
| <i>Beauveria</i> sp. | 2.95x10 ⁸ | 8.4593 ^a |
| LBB-1 | 2.78x10 ⁸ | 8.3843 ^a |
| C.V (%) | 2.34. | |
| ESx | 0.10 ^{NS} | |

Means with the same letters do not differ significantly, according to Tukey ($p \leq 0.05$).

The conidia production by *Beauveria* sp. isolate (2.95x10⁸ conidia. mL⁻¹) is higher than those observed by Dhar *et al.* (2016) (2.66x10⁷ conidia mL⁻¹) and Jordan *et al.* (2021) (2.8 x 10⁷ conidia adult⁻¹) showing that sporulation depends, among other factors, on the isolate. The size of the conidia is also a feature that may influence its utility as control agent.

The microscopic observations revealed that *Beauveria* sp. isolate microcultures had branches of mycelium and conidiophores forming clusters (Figure 4), and showed an irregular (zigzag) shape. The designated features were similar for the isolate under study and the LBB-1 strain. The conidia of the studied isolates are hyaline, round to ovoid, born individually from a single cell (Figure 5). The average size of the conidia varies from 2.9 ± 0.40 μm and 2.3 ± 0.4 to 2.4 ± 0.30 μm long and wide respectively (Table 2).

According to Kirubhadharsini *et al.* (2017), the microscopic observations of the conidia showed that they were single cells, round to oval in shape with 2-3 μm length, with hyaline hyphae and zigzag rachis in all the isolates. These characteristics were present in the *Beauveria* sp. isolate from Cuba. The conidia characteristics (hyaline, round) of the *Beauveria* sp. isolate are also similar to those reported by Chen *et al.* (2018) for *B. majiangensis*, who also described that the conidiophores of this species form clusters. This isolate also overlaps with the features and keys described by Samson *et al.* (1988) for *B. bassiana*.

The Cuban isolate showed conidia of slightly larger size to that of the commercial LBB-1 strain (Table 2). In terms of the biological product dosage for application in the field, larger conidia mean a lower number of conidia per volume.

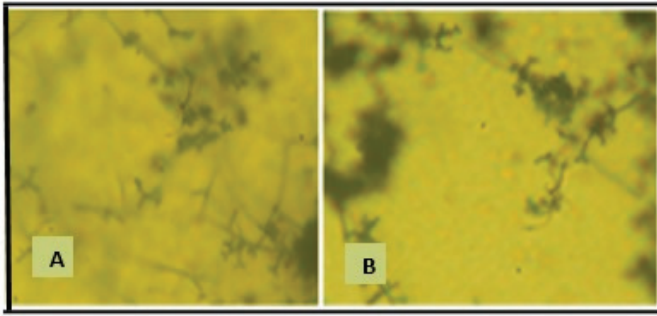


Figure 4. Morphology and outlook of the conidiogenic cells of the *Beauveria* sp. isolate and the *B. bassiana* LBB-1 strain. A: *Beauveria* sp. isolate; B: LBB-1 strain (Photo: NLCD-307 microscope (40X) with Software-NMS designed for the Windows CE5.0 system).

Figura 4. Morfología y panorama de las células conidiógenas del aislado de *Beauveria* sp. y la cepa LBB-1 de *B. bassiana*. A: aislado de *Beauveria* sp.; B: cepa LBB-1 (Foto: Microscopio NSZ-808 con Software-NMS diseñado para el sistema Windows CE5.0).

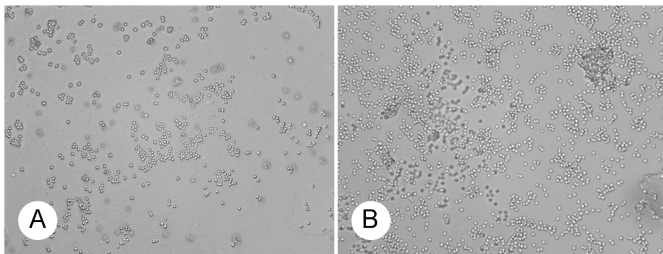


Figure 5. Conidia shape. A: *Beauveria* sp. isolate; B: *B. bassiana* LBB-1 strain (Photo: NLCD-307 microscope (40X) with Software-NMS designed for the Windows CE5.0 system).

Figura 5. Forma de conidios. A: aislado de *Beauveria* sp.; B: cepa LBB-1 de *B. bassiana* (Foto: Microscopio NSZ-808 con Software-NMS diseñado para el sistema Windows CE5.0).

Table 2. Conidia size of the *Beauveria* sp. isolate and *B. bassiana* strain LBB-1 (µm) (n= 50).

Tabla 2. Tamaño de los conidios del aislado *Beauveria* sp. y cepa LBB-1 de *B. bassiana* (µm) (n = 50).

| | Conidia size (µm) | |
|-----------------------------|-------------------|-----------|
| | Length | Width |
| <i>B. bassiana</i> isolates | 2.9 ± 0.4 | 2.4 ± 0.3 |
| Strain LBB-1 | 2.7 ± 0.2 | 2.4 ± 0.3 |

Means with the same letters do not differ significantly, according to Tukey (p≤0.05).

Enzymatic characteristics

No differences were observed when the protease enzyme activity was evaluated (Table 3). The isolate and the commercial strain produced a great hydrolysis halo in the three evaluated moments. From such result, it was inferred that both fungi had large enzymatic synthesis, which indicates a good mechanism of infection. On the other hand, lipase enzyme activity showed significant differences between the two fungi (Table 4). In the second observation, both the autochthonous isolate and LBB-1 strain produced similar large hydrolysis halos. However, in the third evaluation (7 days), the autochthonous isolate produced a larger halo of hydrolysis, being statistically different from the commercial strain.

Table 3. Protease enzyme activity (halo in mm).

Tabla 3. Actividad de la enzima proteasa (halo en mm).

| Isolates | Time (days) | | | | | |
|------------------------------|---------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|
| | 2 | | 4 | | 6 | |
| | X orig. | X transf. | X orig. | X transf. | X orig. | X transf. |
| <i>Beauveria</i> sp. isolate | 2.666 | 1.908 ^a | 5.633 | 2.576 ^a | 4.550 | 2.354 ^a |
| LBB-1 | 1.666 | 1.728 ^a | 3.333 | 2.081 ^a | 3.250 | 2.061 ^a |
| C.V. (%) | 4.79 | | | | | |
| ESx | 0.065 ^{NS} | | | | | |

Means with the same letters do not differ significantly, according to Tukey (p≤0.05).

Table 4. Lipase enzyme activity (halo in mm).

Tabla 4. Actividad de la enzima lipasa (halo en mm).

| Isolates | Time (days) | | | | | |
|------------------------------|---------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|
| | 3 | | 5 | | 7 | |
| | X orig. | X transf. | X orig. | X transf. | X orig. | X transf. |
| <i>Beauveria</i> sp. isolate | 6.666 | 2.769 ^a | 9.500 | 3.230 ^a | 13.333 | 3.786 ^a |
| LBB-1 | 5.833 | 2.444 ^b | 6.833 | 2.801 ^a | 9.333 | 3.163 ^b |
| C.V. (%) | 8.75 | | | | | |
| ESx | 0.120 ^{NS} | | | | | |

Means with the same letters do not differ significantly, according to Tukey (p≤0.05).

The analyses done on protease enzyme activity showed no significant differences between the isolate and the commercial strain. Regarding the lipase enzyme activity at day seven, significant differences were found between the fungi, with the Cuban isolate having higher activity. The proteolytic and lipolytic activities were shown to be essential factors in the pathogenic activity of *B. bassiana* (Borgi *et al.*, 2016). Pelizza *et al.* (2020) correlated the proteolytic activity of one of the studied isolates of *B. bassiana* (LPSc 1227) with the highest mortality of *Schistocerca cancellata*, also, Khosravi *et al.* (2015) and Dhawan and Joshi (2017) reported that fungal isolates which produced the maximum values of proteolytic and chitinolytic activity were those that produced higher mortality on the rose sawfly, *Arge rosae* and the caterpillar *Pieris brassicae*, respectively.

Regarding to lipase activity, Seyed-talebi *et al.* (2020) found a positive correlation between virulence of several *B. bassiana* isolates (TV, OZ, UN, DV and DE) with *Eurygaster integriceps* cuticle. Kaur and Padmaja (2009) and Robledo-Monterrubio *et al.* (2009) reported similar results against *Helicoverpa armigera*, *Sphenarium purpurascens*, *Acheta domesticus*, and *Tenebrio molitor* larvae. Palem and Padmaja (2013) showed that virulence of *B. bassiana* isolates against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* was not correlated with lipase activity.

The results obtained in this investigation related to enzymatic activity are in agreement with all the mentioned research, since the proteolytic and lipolytic activities of the new isolate are related directly to *C. formicarius* mortality.

The production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi, according to Gomes *et al.* (2012), reveals their physiological and biological apparatus, showing their specialization in the degradation of numerous substances found in different hosts or environments. This knowledge of the enzymatic characteristics not only gives the idea of the pathogenic capabilities, but also indicates that substrates rich in lipids and proteins can be used for their reproduction.

Pathogenic characteristics

The results of *C. formicarius* mortality caused by the autochthonous isolate and the commercial strain (LBB-1) of *B. bassiana* under laboratory conditions, showed no significant differences between them (Table 5).

Table 5. *C. formicarius* Mortality caused by *B. bassiana* isolate and the *B. bassiana* LBB-1 strain (%).

Tabla 5. Mortalidad de *C. formicarius* causada por el aislado de *Beauveria* sp. y la cepa LBB-1 de *B. bassiana* (%).

| Isolates | X orig. | X transf. |
|------------------------------|---------|--------------------|
| LBB-1 | 48.3 | 0.63 ^a |
| <i>Beauveria</i> sp. isolate | 50.0 | 0.63 ^a |
| CV (%) | | 13.73 |
| ESx | | 1.73 ^{NS} |

Means with the same letters do not differ significantly, according to Tukey ($p \leq 0.05$) test.

The results of the mortality experiments showed no intraspecific variability in the biological effectiveness of the *Beauveria* sp. isolate and the LBB-1 strain on *C. formicarius*. Usually, different isolates of the same entomopathogenic microorganism show differences in their virulence on the same insect host (Sung, 2008), but in the present study, differences between the two isolates were not significant. Similar results were reported by Seyed-talebi *et al.* (2020) in the control of *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae). Bagus *et al.* (2019) found that *B. bassiana* effectively eliminate the pest (*C. formicarius*) with a mortality rate of 91.67%. In a similar experiment, Hlerema *et al.* (2017) described promising results with the use of *B. bassiana* in the control of *C. formicarius* with significantly reduction in the percentage of insect damaged roots (5.31%). In the present research, the *C. formicarius* mortality induced by the Cuban isolate and the commercial strain was similar but the Cuban isolate showed the potential to become an agent for biological control.

Molecular characteristics

The PCR amplification of the autochthonous isolate with primers ITS-1 and ITS-4 is shown in Figure 6.

The PCR fragment amplified of the *Beauveria* sp. isolate using the ITS1-ITS4 primers was of 600 bp. This fragment size is similar to that found in four strains of *B. bassiana* (BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4, BBPTG6), where the amplification of the ITS regions revealed bands of around 600 bp (López, 2015). Gebremariam *et al.* (2021) identified seven *B. bassiana* isolates using the same primers and a single product of 545

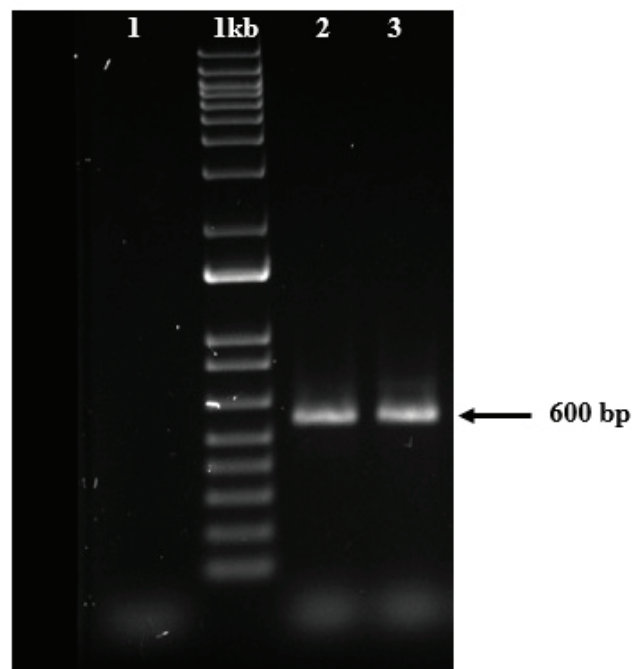


Figure 6. ITS amplification of the isolate by PCR. (1): negative control; (1 kb): marker; (2) positive control and (3): isolated fragment.

Figura 6. Amplificación ITS del aislado por PCR. (1): control negativo; (1 kb): marcador; (2) control positivo y (3): fragmento aislado.

bp fragment size was obtained. Some other results showed fragments size between 500-560 bp for eight *B. bassiana* isolates (Mora *et al.*, 2016; Belay *et al.*, 2017). As a conclusion isolates fragments sizes of *Beauveria* sp. using the ITS1-ITS4 primers are between 500 and 600 bp.

A consensus sequence was obtained by alignment of the forward and reverse sequences of this region and deposited in GenBank with the accession number MK246940.

From the phylogenetic analysis, this isolate was identified as *B. bassiana*, as it constitutes a monophyletic group with other *B. bassiana*'s accessions retrieved from GenBank. The analysis was done using sequences from different parts of the world, giving identities between 96 and 99% (Figure 7).

Using the ITS sequence information, four clades have been identified, and the polytomous topology suggests a high genetic similarity among *Beauveria* isolates (clade 1). However, other studies pointed out a high genetic differentiation among *Beauveria* lineages with intercontinental distribution (González-Mas *et al.*, 2019; Kazartsev and Lednev, 2021). Moreover, Ramos *et al.* (2017) identified five putative lineages of *B. bassiana* occurring naturally in Cuban fields, and the phylogenetic results of the present study are in agreement with their finding.

Recently, some researches have investigated the efficiency of *B. bassiana* isolates in the control of several insects (Toledo *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017); however, this is the first report with a molecular characterization of an autochthonous isolate of *B. bassiana* in Cuba.

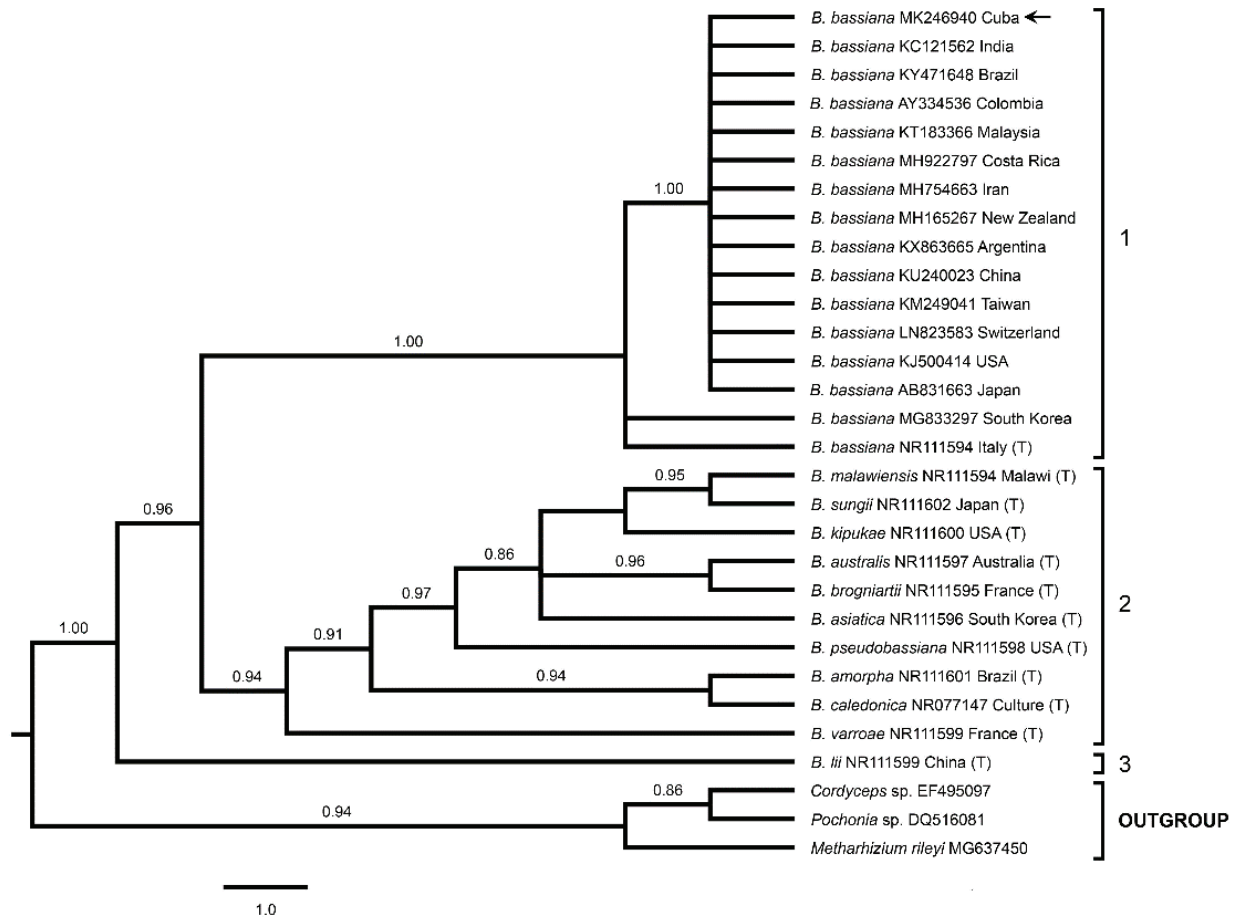


Figure 7. Phylogenetic analysis of the *Beauveria* genus, including different *B. bassiana* isolates from different regions. The autochthonous isolate is indicated by an arrow and (T) indicates *Beauveria* species' type materials (Numbers above branches indicate posterior probabilities).

Figura 7. Análisis filogenético del género *Beauveria* incluyendo diferentes aislados de *B. bassiana* de diferentes regiones. El aislado autóctono se indica con una flecha y (T) indica los materiales tipo de la especie *Beauveria*. (Los números sobre los ramos indican probabilidades posteriores).

CONCLUSIONS

The results of this investigation demonstrate that under the natural conditions of Mayabeque province, it is possible to obtain autochthonous entomopathogenic fungi isolates from several pest hosts, such as *A. insularis* and adults of the coffee borer (*H. hampei*). The morphological characteristics described for the entomopathogenic fungus are consistent with the morphology of *B. bassiana*. The molecular characterization of the *Beauveria* sp. Cuban isolate showed a band of 600 bp and through the phylogenetic study, four clades were identified and the polytomic topography recovered for clade 1 indicates a high genetic similarity (99-96%) with *B. bassiana* from several countries. Morphological, pathogenic and molecular characterization allowed the exact species of the new isolate to be identified as *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

REFERENCES

Affiah, L. and Saputro, N. W. 2020. Growth and viability of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different alternative media. Earth and Environmental Science. 468: 1-8. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/468/1/012037>.

Altekar, G., Dwarkadas, S., Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. 2004. Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. Bioinformatics. 20:407-415. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg427>.

Bagus, T.S., Prayogo, Y., Lazuardi, F. R., Hidayatul, N.A. 2019. The virulence improvement of *Beauveria bassiana* in infecting *Cylas formicarius* modulated by various chitin based compounds. Biodiversitas. 20(9): 2486-2493. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200909>.

Barrat, B. I. P., Moran, V. C., Bigler, F. and Van Lenteren, J. C. 2018. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. BioControl. 63:155-167. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9831-y>.

Belay, Y.C., Meressa, B.H., Alemu, T. and Hallmann, J. 2017. Molecular detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* isolates from soils of coffee growing areas in Ethiopia using rDNA-ITS. Journal of Applied Biosciences. 119:11943-11953. https://www.researchgate.net/publication/333930208_Published_online_at_wwwmelewaorg_on.

Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Sayers, E.W. 2013. Genbank. Nucleic Acid Research. 41:D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1070>.

- Borgi, I., Dupuy, J.W., Blibech, I., Lapaillerie, D., Lomenech, A. M., Rebai, A., Ksantini, M., Bonneu, M. and Gargouri, A. 2016. Hyper-proteolytic mutant of *Beauveria bassiana*, a new biological control agent against the tomato borer. *Agronomy for Sustainable Development*. 36:1-9, <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0394-6>.
- Bueno, A. F., Carvalho, G. A., Dos Santos, A. E., Sosa-Gómez, D. R. and Da Silva, D. M. 2017. Pesticide selectivity to natural enemies: challenges and constraints for research and field recommendation. *Ciência Rural*. 47(6):1-10. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160829>.
- Chen, W-H., Liu, M., Huang, Zh-X., Yang, G-M., Han, Y-F., Liang, J-D. and Liang, Z-Q. 2018. *Beauveria majiangensis*, a new entomopathogenic fungus from Guizhou, China. *Phytotaxa*. 333(2): 243-250. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.333.2.8>.
- Dhar, S., Jindal, V., Jariyal, M. and Gupta, V.K. 2019. Molecular characterization of new isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and their efficacy against the tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 29(8):1-9. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0110-3>
- Dhar, S., Jindal, V. and Gupta, V. K. 2016. Optimization of growth conditions and medium composition for improved conidiation of newly isolated *Beauveria bassiana* strains. *Journal of Experimental Biology*. 54(10):634-643. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30084563/>.
- Dhawan, M. and Joshi, N., 2017. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 522-529. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.004>.
- Gebremariam, A., Chekol, Y. and Assefa, F. 2021. Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. *Heliyon*. 7: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07091>.
- Gomes, E., Maia, H., Feltrin, T. and Van Der, S.T. 2012. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43(2):827-833, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200049>.
- González-Mas, N., Ortega-García, L., Garrido-Jurado, I., Dembilio, O., Jaques, J.A., Quesada-Moraga, E. 2019. Which came first: The disease or the pest? Is there a host mediated spread of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) by invasive palm pests?. *Journal of Invertebrate Pathology*. 162: 26-42. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.01.007>.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT (ver. 7.0.9.0. 2007). *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98. https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user-friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT.
- Hlerema, I., Laurie, S. and Eiasu, B. 2017. Preliminary observations on use of *Beauveria bassiana* for the control of the sweet potato weevil (*Cylas* sp.) in South Africa. *Open Agriculture*. 2: 595-599. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0063>.
- Hua, J., Fu, Y., Zhou, Q., Huang, Y., Li, H., Chen, T., Ma, D. and Li, Z. 2021. Three chemosensory proteins from the sweet potato weevil, *Cylas formicarius*, are involved in the perception of the host plant volatiles. *Pest Management Science*. 77(10): 4497-4509. <https://doi.org/10.1002/ps.6484>.
- Humber, R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. In: Lawrence AL (Ed.) "Manual of Techniques in Invertebrate Pathology" Second Edition. Academic Press, New York. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3>.
- Jordan, C., dos Santos, P.L., Oliveira, L.R., Magalhães, D. M., Costa, G.B.C., Fonseca, R. M., Moura, M. G. and Frederico, W. C. 2021. Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien Eucalyptus pest *Gonipterus platensis* in Brazil. *Scientific Reports*. 11: 7233. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86638-9>.
- Kaur, G. and Padmaja, V. 2009. Relationships among activities of extracellular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*. *Journal of Basic Microbiology*. 49: 264-274. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800156>.
- Kazartsev, I.A. and Lednev, G.R. 2021. Distribution and Diversity of *Beauveria* in Boreal Forests of Northern European Russia. *Microorganisms*. 9: 1409. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071409>
- Khosravi, R., Sendi, J.J., Zibae, A. and Shokrgozar, M.A., 2015. Virulence of four *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Asc., Hypocreales) isolates on rose sawfly, *Arge rosae* under laboratory condition. *Journal of King Saud University-Science*. 27, 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.04.003>.
- Kirubadharsini, B.L., Nakkeeran, S., Kennedy, J.S. and Manoharan, T. 2017. Morphological and molecular characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* isolated from different insects in India. *Green Farming*. 8(4):940-944. https://www.researchgate.net/publication/319976659_Morphological_and_molecular_characterization_of_entomopathogenic_fungi_isolated_from_different_Beauveria_bassiana_insects_in_India.
- López, MOT. 2015. Empleo de marcadores moleculares para el análisis de la prevalencia y diseminación de cepas de *Beauveria bassiana*. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con acentuación en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. <https://1library.co/document/1y98e8lz-empleo-marcadores-moleculares-analisis-prevalencia-diseminacion-beauveria-bassiana.html>.
- Martins, C.C., Alves, L.F.A., Mamprim, A.P. and Souza, L.P.A. 2015. Selection and characterization of *Beauveria* spp. isolates to control the broad mite *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) (Acari: Tarsonemidae). *Brazilian Journal of Biology*. 76(3):629-637. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.22614>.
- Mora, M.A.E., Chacon-Orozco, J.G., Harakava, R., Rouws, J.R.C. and Fraga, M.E. 2016. Molecular characterization and virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *African Journal of Microbiology Research*. 10(19):662-668. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.7973>.
- Palem, P. C. and Padmaja, V. 2013. Functional interplay of certain pathogenicity determinant factors governing virulence of the entomopathogenic fungal species *Beauveria*. *International Journal of Research in Biosciences*. 2 (2): 83-92. <https://www.ijrbs.in/index.php/ijrbs/article/view/82>.

- Pelizza, S.A., Medina, H., Ferreri, N. A., Eliades, L. A., Pocco, M.E; Stenglein, S.A. and Lange, C.E. 2020. Virulence and enzymatic activity of three new isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) from the South American locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). Journal of King Saud University-Science. 32: 44-47. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.11.006>.
- Polanco, F.L.G., Alvarado, G.O.G., Pérez, G.O., González, G.R. and Olivares, S. E. 2019. Fungi associated with the regressive death of citrus fruits in Nuevo Leon and Tamaulipas, Mexico. Revista Mexicana Ciencias Agrícolas. 10(4): 757-764. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>.
- Qiu, L., Li, J.J., Li, Z. and Wang, J.J. 2019. Production and characterization of biocontrol fertilizer from brewer's spent grain via solid-state fermentation. Scientific Reports. 9(480): 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36949-1>.
- Rambaut, A. 2016. *FigTree v 1.4.3*. [Access 20 January 2019]. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ramos, Y., Portal, O., Lysøe, E., Meyling, N.V. and Klingen, I. 2017. Diversity and abundance of *Beauveria bassiana* in soils, stink bugs and plant tissues of common bean from organic and conventional fields. Journal of Invertebrate Pathology. 150:114-120, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.10.003>.
- Robledo-Monterrubio, M., Alatorre-Rosas, R., Viniegra-González, G. and Loera, O. 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. Journal of Invertebrate Pathology. 101: 222-227. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.007>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der, M.P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchar, M.A. and Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic biology. 61:539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Samson, R.A., Evans, H.C. and Latgé, J.P. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Berlin. ISBN: 9783540188315.
- SAS Institute Inc. 2016. SAS® 9.4 Language Reference: Concepts, Sixth Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. ISBN: 978-1-62960-822-8.
- Seyed-talebi, F.S., Safavi, S.A., Talaei-Hassanloui, R. and Bandani, A. 2020. Variable induction of cuticle-degrading enzymes of *Beauveria bassiana* isolates in the presence of different insect cuticles. Journal of Crop Protection. 9(4): 563-576. <https://jcp.modares.ac.ir/article-3-40182-en.html>.
- Sung, G.H., Poinar, G.O. and Spatafora, J.W. 2008. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. Molecular Phylogenetics and Evolution. 49:495-502. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.08.028>.
- Swiergiel, V., Meyling, N.V., Porcel, M. and Rämert, B. 2016. Soil application of *Beauveria bassiana* GHA against apple sawfly, *Hoplocampa testudinea* (Hymenoptera: Tenthredinidae): Field mortality and fungal persistence. Insect Science. 23:854-868. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12233>.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. ClustalW: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22:673-680, <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Toledo, J., Flores, S., Campos, S., Villaseñor, A., Enkerlin, W., Liedo, P., Valle, A. and Montoya, P. 2017. Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitidis capitata*. Entomology Experimental Applied Journal. 164:340-349. <https://doi.org/10.1111/eea.12608>.
- Vargas-Martínez, A., Salazar-Blanco, J.D., González-Herrera, A. y Molina-Bravo, R. 2019. Análisis genético de *Beauveria* y *Metarhizium* tropicales asociados a insectos en caña de azúcar. Agronomía Mesoamericana. 30(1):267-280, <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.32307>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: "PCR Protocols: A guide to methods and applications", (Eds.) Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. pp 315-322. Academic Press, San Diego. https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics.
- Yu, J.S., Lee, S.J., Shin, T.Y., Kim, W.J. and Kim, J.S. 2020. Enhanced thermotolerance of entomopathogenic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* JEF-isolates by substrate modification. International Journal of Industrial Entomology. 41(2): 28-35. <http://dx.doi.org/10.7852/ijie.2020.41.2.28>.
- Yuan, H., Lei, Z., Rondón, S.I. and Gao, Y. 2017. Potential of a strain of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for the control of the potato tuberworm, *Phthorimaea operculella* (Zeller). International Journal of Pest Management. 63(4):352-354. <https://doi.org/10.1080/09670874.2016.1269975>.

Impact of L-cysteine addition on nixtamalized corn dough: proteins and viscoelasticity

Impacto de la adición de L-cisteína en la masa de maíz nixtamalizado: proteínas y viscoelasticidad

Chaidez-Laguna LD¹, Torres-Chávez PI^{1*}, Ramírez-Wong P¹, Márquez-Ríos E¹, Islas-Rubio AR², Carvajal-Millán E², Juárez-Onofre JE³

¹ Universidad de Sonora, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Rosales y Blvd. Luis Encinas J. S/N. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a La Victoria km 0.6, C.P. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

³ Universidad de Sonora, Departamento de Física, Universidad de Sonora. Rosales y Blvd. Luis Encinas J. S/N. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

The effect of L-cysteine on the solubility, protein structure, rheological and textural characteristics of corn masa was investigated. Corn masa was prepared by adding L-cysteine at two levels (0.25, 0.50 %). Size exclusion chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy were utilized for protein characterization. Dynamic rheology and textural profile analysis were carried out on corn masa. There was a significant difference in relative solubility between the control and masa containing L-cysteine. Treatments with L-cysteine increased the relative solubility of proteins. FT-IR spectroscopy revealed that addition of L-cysteine did not affect the secondary structure of protein. Results also showed significant differences in textural properties. Masas with L-cysteine improved masa springiness, adhesiveness and cohesiveness. This investigation revealed that L-cysteine, improves the elasticity or storage modulus, important characteristics of corn masa.

Key words: L-cysteine, corn masa, proteins solubility, FT-IR, rheological properties

RESUMEN

Se investigó el efecto de la L-cisteína en la solubilidad, estructura proteica, características reológicas y texturales de masas de maíz. La masa se preparó con L-cisteína a dos niveles (0.25, 0.50 %). La cromatografía de exclusión por tamaño y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier se utilizaron para la caracterización de proteínas. Se realizaron análisis de reología dinámica y perfil de textura. Hubo una diferencia significativa en la solubilidad relativa entre el control y las masas que contienen L-cisteína. Los tratamientos con L-cisteína aumentaron la solubilidad relativa. La determinación de FT-IR reveló que la adición de la L-cisteína no tuvo efecto en la estructura secundaria de la proteína. Los datos también mostraron diferencias significativas en las propiedades de textura. Masas con L-cisteína mejoraron la elasticidad, adhesividad y cohesión. Esta investigación revela que la L-cisteína mejora la elasticidad o los módulos de almacenamiento,

características importantes de la masa de maíz.

Palabras clave: L-cisteína, masa de maíz, solubilidad de proteínas, FT-IR, propiedades reológicas

INTRODUCTION

Corn tortillas are one of the most important staple foods on the daily diet for Mexico and Central America. In Mexico, the tortilla consumption *per-capita* is around 75 kg/year (Solano-Perez, 2018). Tortillas have been elaborated using fresh masa prepared from traditional nixtamalization, extruded and instant nixtamalized corn flours (Arambula *et al.*, 1999). These processes promotes important structural, physicochemical, and nutritional alterations in corn components (Quintanar-Guzman *et al.*, 2011). It has been reported that changes occurring in starch, are responsible for the rheological and textural properties of masa and final products (Campas-Baypoli *et al.*, 1999). However, it has been recently proposed that corn prolamins could affect the rheological behavior of masa (Chaidez-Laguna *et al.*, 2016).

Corn masa must have cohesiveness, adhesiveness, and machinability properties, which are necessary for proper processing; besides, they have an impact on the rheological properties of the corn masa and, therefore, on the quality of tortilla. Corn tortillas should be flexible and rollable, textural characteristics that are affected during storage, observing an increase in firmness and brittleness. In general, tortilla has a short shelf life suffering several physical and chemical changes attributed to starch retrogradation (Campas-Baypoli *et al.*, 1999). To try to solve this problem, strategies have been implemented, such as addition of hydrocolloids and enzymes.

Hydrocolloids have been investigated for making quality corn extruded masa, including xanthan gum, carboxymethylcellulose, guar gum, or a gums blends (Aguirre-Cruz *et al.*, 2005; Platt-Lucero *et al.*, 2010). These researchers have reported that hydrocolloids can improve masa properties, providing high water absorption capacity, which is closely related to the final textural characteristics of tortilla.

*Autor para correspondencia: Patricia Isabel Torres Chávez
 Correo electrónico: patricia.torres@unison.mx

Recibido: 10 de septiembre de 2021

Aceptado: 18 de enero de 2022

Other investigations have focused on the use of enzymes, to improve flours functionality (Gys *et al.*, 2004) and textural properties of corn tortillas (Platt-Lucero *et al.*, 2013). Moreno-Rivas *et al.* (2014) suggested xylanase as a good alternative for the production of less firm corn masa during storage. However, the role of proteins on functionality of the corn masa and tortillas was not considered on these studies.

On the other hand, deficiencies in wheat dough during processing can be overcome by the incorporation of additives and enzymes which change the functionality of the proteins (Joye *et al.*, 2009). Food additives such as L-cysteine can have effects on the masa functionality, which is the reason of its use in the present investigation. L-cysteine contains thiol groups, recognized as a reducing agent that stabilize free radical species generated during processing of bread or wheat tortillas (Koh *et al.*, 1996; Li and Lee, 1996). Also, L-cysteine modifies the disulfide bonds proportion and rheological characteristics of bread dough (Gomez *et al.*, 2005), and decreases their resistance to extension, dough hardness, and viscosity (Angioloni and Rosa, 2007).

There is no evidence in the literature about the effect of L-cysteine on corn masa, therefore, the aim of this investigation was to evaluate the addition of L-cysteine in protein solubility, viscoelastic properties, and texture of corn masa.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Commercial white maize and commercial lime (calcium hydroxide; purity ~ 91 % cal pirámide) were acquired from a local store. L-cysteine hydrochloride monohydrate (7048-04-6), acetonitrile (75-05-8), 1-propanol (78-83-1), and trifluoroacetic acid (76-05-1) (HPLC-grade) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Nixtamalization process

Four kg corn were cooked in 12 L of lime solution at 1 % (grain weight basis). Maize was cooked for 20 min at boiling temperature and steeped in the same cooking vessel for 14 h. The cooking solution or “nejayote” was discarded and the resulting nixtamal was washed two times with water, to remove brain and excess lime. Nixtamal was ground into masa with a final moisture content of 56.0 %, using a commercial stone grinder.

Masa preparation

Fresh masa was made according to Ramirez-Wong *et al.* (1994), with slight modifications. The fresh masa was homogenized for 30 s. L-cysteine prepared at concentrations of 0.25 and 0.5 %, was dissolved in the water before masa preparation, then gradually incorporated and mixed for 3 min at room temperature. The samples were stored in plastic bags at $40 \pm 1^\circ\text{C}$ for 30 min, in order to reduce the starch retrogradation.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis

FTIR spectra of control masa (CM), 0 %; L-cysteine dose 1, 0.25 % and L-cysteine dose 2, 0.50 % (w/v) corn masa were recorded on a Nicolet FT-IR spectrometer (Thermo Scientific Nicolet iS50-FTIR) equipped with a diamond attenuated total reflectance (ATR) cell with a 45° aperture angle, a liquid nitrogen-cooled MCTA detector, and OMNIC software. Samples signals were obtained at 25°C in transmission mode from 600 to 4000 cm^{-1} at 4 cm^{-1} resolution. Curve deconvolution, fitting, and peak assignment were done with PeakFit software (v4.11 Systat Software Inc., Point Richmond, CA) to quantify protein secondary structure (α -helix at $1652\text{--}1657\text{ cm}^{-1}$ and β -sheet at $1620\text{--}1637\text{ cm}^{-1}$) from the resolved spectra.

Sample preparation before protein analysis

All samples were prepared according to Lending *et al.* (1988).

Protein extraction and size exclusion high-resolution liquid chromatography (SE-HPLC)

The defatted samples were analyzed according to Bean *et al.* (1998), with several modifications. Flours (250 mg) were mixed with 1 mL of 50 % 1-propanol. Samples were placed in a stirrer (Vortex Genie2, Scientific Industries, Bohemia, NY) and vortexed continuously for 15 min. Samples were then centrifuged (Eppendorf AG, 5415 Hamburg) at $8000 \times g$ for 5 min, and the supernatant was recovered. The supernatant was centrifuged at $14000 \times g$ for 15 min and analyzed by size exclusion high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC). The HPLC system consisted of an Agilent quaternary pump and a diode array detector (Model 1260, Agilent Technologies, Pittsburgh, PA, USA) with a Biosep-SEC-S 4000 column (Phenomenex, Torrance, CA). The mobile phase was acetonitrile-water (50:50 v/v) containing 0.1 % trifluoroacetic acid at a constant flow rate of 0.8 mL min^{-1} . The chromatographic profile was analyzed using Open Lab Software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). SE-HPLC measurements were performed in triplicate.

Viscoelastic properties

After mixing, samples were rested in plastic bags at $40 \pm 1^\circ\text{C}$ for 30 min. Rheological properties of masa formulations were studied by a rheometer (Rheometrics Scientific, model RSF III. Piscataway, NJ, USA) equipped with parallel plates of 25 mm diameter and a chamber for temperature control (Platt-Lucero *et al.*, 2010). Approximately 2.5 g of masa was compressed between two plates separated by a gap of 2.5 mm. The parallel plates were covered with petroleum jelly to avoid loss of moisture during the test.

A frequency sweep test, ranging from 0.1 to 100 rad/s , was used to study the masa rheological properties. The test was carried out using a software (RSI Orchestrator, Rheometrics Scientific). The viscoelastic behavior obtained in the frequency range used were the storage modulus (G'), the amount of energy that is stored, the loss modulus (G''), the

amount of energy dissipated in the material after deformation and tangent of the phase angle $\tan \delta$ (G''/G'). The tests were carried out by triplicate.

Texture profile analysis (TPA) of masas

Texture profile analysis (TPA) was performed using a texturometer (Model TA-XT2, Surrey, UK) equipped with a cylinder probe with 36 mm diameter was used in this test according to AACC standard method 74-9 (AACC, 2000). A 3 g load cell was used at the speed of 1 mm s⁻¹. The masa samples were cut in a cylinder shape. The probe was moved down in certain speeds up to 50 % of samples height, and then moved back up in the same speed, and this movement was repeated in a 10 s time interval. Indicators determined by this test include springiness, cohesiveness and adhesiveness, obtained using the texturometer (Stable Micro System TA.TXplus Texture Analyzer). The test was done by five replications.

Statistical analysis

A completely randomized design was used. Data were statistically analyzed by a one-way ANOVA test with a significance level of 5 % ($p < 0.05$). Significant differences among specific treatment means were defined using Tukey's test. All statistical analyses were performed using XLSTAT.

RESULTS AND DISCUSSION

Solubility study

The relative solubility of corn proteins in 50 % propanol was determined by the area under the curve in the SE-HPLC chromatograms. Figure 1 A–C shows the chromatograms of the effect of L-cysteine in proteins solubility samples extracted with 50 % propanol. Total soluble protein was significantly ($p < 0.05$) different in corn, masa treatments, and nixtamal. The amount of soluble polymeric protein increases from maize to nixtamal and is reduced in the masa, which is in accordance with previous studies (Chaidez-Laguna *et al.*, 2016). However, an increase in the proportion of the soluble polymer protein (SPP) was observed in the treatments that contained L-cysteine. Table 1 summarizes the results of the effect of cysteine on the corn masa. The addition of L-cysteine into corn masa causes an increase in the SPP compared to control masa (Table I). L-cysteine, at dose 2, showed the largest increase on the solubility, which can be attributed to the L-cysteine mechanism of action, which break the disulfide bonds forming sulfhydryl groups. Therefore, the protein solubility is increased, modifying the strength and structure of the existing protein network (Bloksma 1990). The results obtained are similar to those found in wheat flour doughs added with L-cysteine (Angioloni and Rosa, 2007; Popineau *et al.*, 2002).

FT-IR Analysis

The FTIR spectra were deconvoluted and are shown in Figure 2. The effect of L-cysteine on the secondary structure of the protein was analyzed through the region correspon-

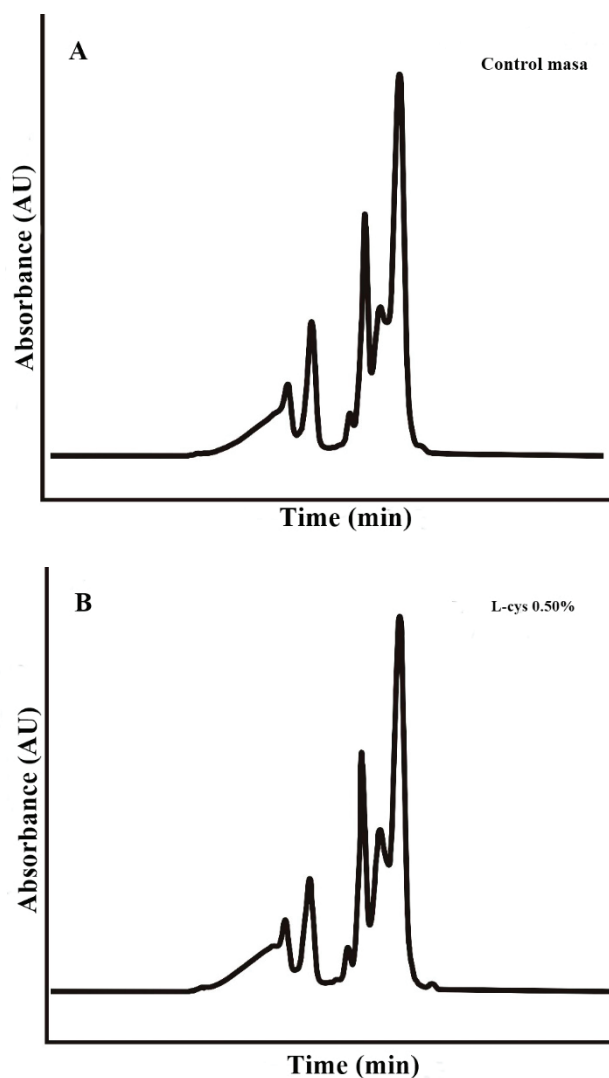


Figure 1. SE-HPLC chromatograms of control and L-cysteine dose 2 masa. **Figura 1.** Cromatogramas SE-HPLC de la masa control y la masa con L-cisteína dosis 2.

Table 1. Effect of L-cysteine addition on soluble polymeric protein (SPP), total soluble protein (TSP) of corn masas nixtamalized.

Tabla 1. Efecto de la adición de L-cisteína en la proteína polimérica soluble (PPS), proteína soluble total (PST) en las masas de maíz nixtamalizadas.

| Treatments | SPP ^{1,2} (AU x 10 ⁹) | Other fractions ¹ (AU x 10 ⁹) | TSP ^{1,3} (%) |
|------------------|---|---|---------------------------|
| Maize | 9.88 b | 13.18 b | 23.06 b |
| Nixtamal | 10.40 a | 13.56 a | 23.96 a |
| Control masa | 7.36 e | 11.22 d | 18.58 d |
| 0.25% L-cysteine | 8.54 d | 12.60 c | 21.13 c |
| 0.50% L-cysteine | 9.49 c | 13.63 ab | 22.85 b |

¹ Means in the same column with the same letter did not present significant differences ($p < 0.05$).

¹ Medias en la misma columna con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

² SPP, soluble polymeric protein.

² SPP, proteína polimérica soluble.

³ TSP, total soluble protein, sum of areas of peak chromatogram.

³ TSP, proteína soluble total, suma de áreas del cromatograma.

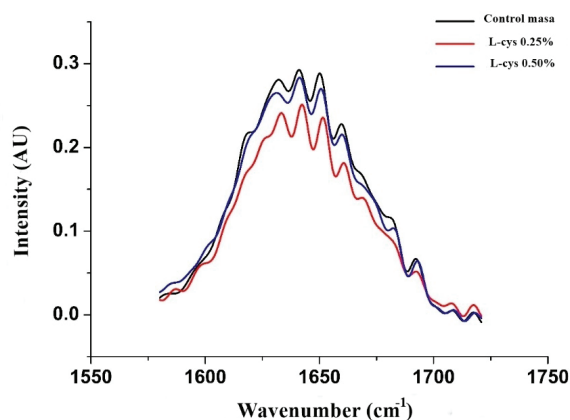


Figure 2. FT-IR spectras deconvoluted. Control masa (black line), L-cysteine masa dose 1 (red line) and L-cysteine masa dose 2 (blue line).

Figura 2. Espectros FT-IR deconvolucionados. Masa control (línea negra); masa L-cisteína dosis 1 (línea roja) y masa L-cisteína dosis 2 (línea azul).

ding to amide I (1650 cm^{-1}). Some authors have suggested that for viscoelastic systems, changes in amide II have the disadvantage of being more sensitive to hydration and, therefore, less reliable in determining the secondary structure (Wellner *et al.*, 1996). The amide I band is wide and contains information of the secondary structure of proteins, such as α -helix, β -sheet, turns, and random protein structure (Surewicz and Mantsch, 1988). It is between $1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$ where we can find the associations with the N-H bending and C-N stretching modes. For control masa and L-cysteine samples, the amide I region showed five main peaks each in all cases. Amide I components centred ~ 1650 and 1660 cm^{-1} (Bandeekar, 1992; Barth and Zscherp, 2002; Barth *et al.*, 1984; Surewicz and Mantsch, 1988) corresponding to α -helix structures (Surewicz and Mantsch, 1988), while bands between $1615 - 1640\text{ cm}^{-1}$, and 1679 cm^{-1} , indicate the presence of β -sheet. Bands at 1653 and 1691 cm^{-1} have been assigned to turns and the disordered structures are located at $\sim 1639 - 1654\text{ cm}^{-1}$ (Barth and Zscherp, 2002).

According to the deconvoluted spectra, the content of α -helice was 46 % for control masa, 45.67 % in masa L-cys dose 1, and 46.72 % for masa L-cys dose 2. These results are in agreement with Argos *et al.* (1982), who demonstrated that the zeins have a content of ~ 50 % of α -helice.

On the other hand, the content of β -sheet structure was 25.71 %, 25.57 % and 25.73 % for control, L-cys dose 1 and L-cys dose 2 masa, respectively. It can be seen that the effect of cysteine on the conformation of β -sheet did not show significant changes in its content. That is, the addition of L-cysteine did not promote the disaggregation of the protein matrix, a necessary condition to functionalize these proteins. This may be due in part to the structure of the zeins. These proteins have a high degree of aggregation and are found in protein bodies. According to Argos *et al.* (1982) and Matsushima *et al.* (1997), it has been proposed that zeins have a helical wheel model where nine homologous repeat units are arranged in an anti-parallel form stabilized by hydrogen bonds, forming hexagonal structures compatible

with hydrogen bonds and hydrophobic interactions. This complex structure prevents the change in the conformation of secondary structure, mainly the increase in the content of β -sheet, which constitutes a condition to functionalize these proteins.

Rheological properties

To obtain a complete description of the mechanical properties of the corn masa, a frequency scan from 0.1 to 100 rad/s was used to determine the influence of L-cysteine on the viscoelasticity of masa. The frequency profiles of the storage moduli (G'), loss moduli (G'') and loss tangent ($\text{Tan } \delta$) of control masa and treatments with L-cysteine, are shown in Fig. 3 A-C, respectively. The masa added with L-cysteine showed lower G' values, in comparison with the control masa (Figure 3 A), that is, these masa showed lower elasticity. However, increasing the concentration of cysteine, increased this value. This can be explained according to the continuous network present in the structure of the protein, where the elasticity of the masa depends of the number of disulfide bonds present on the protein network (Blokma, 1988). These results cannot be compared with previous studies in corn, since to date there are no investigations about the effect of L-cysteine on the rheological properties of corn masa. On the other hand, a different behavior was found in wheat masa, as the moduli G' is expected to grow with the increase of disulphide bonds in wheat gluten. These differences may be due, in part, to the different protein structure of both cereals. Both wheat and corn proteins have complex structures. However, the zeins are highly aggregated and are deposited in protein bodies, surrounded by proteins linked by disulfide bonds (Matsushima *et al.*, 1997) which are highly compact, which limits in the reductor effect of L-cysteine.

Several authors have been suggested that addition of cysteine reduces mixing time, decreasing the elastic component of the masa and promoting its relaxation (Elkhalifa and El-Tinay, 2002; Srinivasan *et al.*, 2000).

In both Figures it was observed high values of G' and low values of G'' for the masas, indicating a highly structured material and an elastic gel-like behavior. These results are in agreement with that reported by Quintanar-Guzman *et al.* (2011) and Santos *et al.* (2014) for masas of nixtamalized corn.

On the other hand, the corn masa began to be relatively more viscous when the concentration of L-cysteine increased from 0.25 to 0.50 %. However, it was appreciated that masa control and masa with L-cys dose 1, presented a very similar behavior. Also, the values of $\text{Tan } \delta$ of the masa with cysteine were lower compared to the control, but when increasing the dose, this value increased (Figure 3 C). In all treatments, the value of $\text{Tan } \delta$ was found between 0.18 - 0.21, that is, less than 0.5, which indicates that the elastic behavior was greater than the viscous. This has previously been mentioned according to the results of $G' y G''$.

Finally, it is necessary to consider that in the formulations of the masa studied, there is a three-dimensional network formed by carbohydrates, proteins, L-cysteine, and

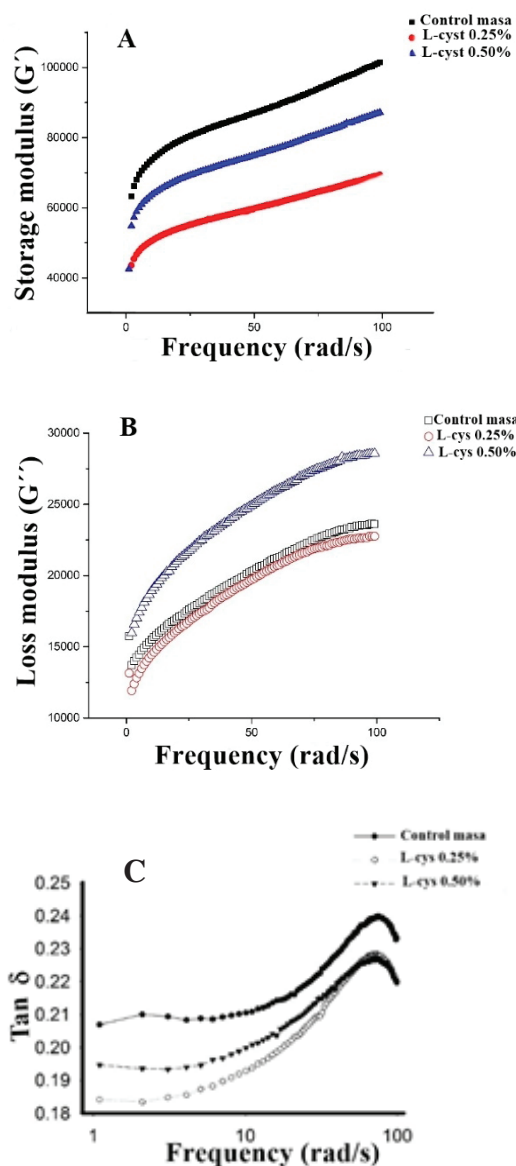


Figure 3. Effect of L-cysteine on rheological properties of masas. A, Storage modulus (G') control masa; L-cysteine dose 1; L-cysteine dose 2 B, Loss modulus (G'') control masa; L-cysteine dose 1; L-cysteine dose 2 C, $\tan \delta$, control masa; L-cysteine dose 1; L-cysteine dose 2.

Figura 3. Efecto de L-cisteína en las propiedades reológicas de las masas. A, Storage modulus (G') masa control; L-cisteína dosis 1; L-cisteína dosis 2 B, Loss modulus (G'') masa control; L-cisteína dosis 1; L-cisteína dosis 2. C, $\tan \delta$, masa control; L-cisteína dosis 1; L-cisteína dosis 2.

water that interact with each other and these interactions play an important role in the rheological properties of the masa.

Textural properties

The texture profile results of masas added with L-cysteine are presented in Table 2. Significant statistical differences were observed in the samples analyzed for each of the properties. The addition of L-cysteine to the corn masas caused a decrease in adhesiveness as compared to the control masa, observing the greatest effect at the lowest

Table 2. Effects of L-cysteine on corn masa texture profile.

Tabla 2. Efectos de la L-cisteína en el perfil de textura de la masa de maíz.

| Treatments | Texture profile analysis | | |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Springiness ¹ | Adhesiveness ¹ | Cohesiveness ¹ |
| Control masa | 0.71 a | -139.45 b | 0.27 a |
| Masa 0.25 % L-cys ² | 0.36 b | -73.34 a | 0.24 b |
| Masa 0.50 %L-cys ³ | 0.48 ab | -91.46 ab | 0.21 c |

¹ Each value is the average of five repetitions. Mean values within column, followed by the same letter did not present significant differences ($p < 0.05$).

² Cada valor es el promedio de cinco repeticiones. Valores promedio con la misma letra, dentro de la columna, no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

³ Masa, L-cysteine dose 1.

² Masa, dosis de L-cisteína 1.

³ Masa, L-cysteine dose 2.

³ Masa, dosis de L-cisteína 2.

concentration. However, the masas with cysteine did not show significant statistical differences for this characteristic between them. Regarding elasticity, it was found that the control masa obtained the highest value, but it was not statistically different from the masa with the higher dose of the amino acid. Therefore, the concentration of added L-cysteine had a determining role in promoting the change in elasticity. This result is consistent with the behavior found in the viscoelastic properties.

Cohesiveness is considered an important textural property of masa. Significant differences were found in the treatments compared to the control masa, although the effect of the amino acid promoted a decrease in the cohesiveness. It was observed that cohesiveness decreased as the L-cysteine dose was increased. Therefore, the masas to which cysteine was added resulted less adhesive. No significant differences were found in the masas added with the amino acid in the adhesiveness (Table 2), so the effect of the amino acid was not dependent on the concentration used. This can be attributed to the effect of L-cysteine in the disulfide bonds that favors its machinability (Angioloni and Rosa, 2007).

In general, these results show that the addition of L-cysteine decreases the adhesiveness and cohesiveness of the masa, but favors the increase in elasticity. It has been proposed that on the masa there should be a balance between these properties, with the purpose of obtaining a manageable masa and after baking, a tortilla that presents adequate textural characteristics during the storage period. However, this stage was not investigated in the present research, and is recommended for future work.

CONCLUSION

The addition of L-cysteine in corn masa changes the solubility and structure of proteins, as well as the rheological and textural properties of corn masa. The reducing agent, L-cysteine promoted the increase in the proportion of SPP of the masa, in addition to diminishing their elastic behavior, adhesiveness and cohesiveness. However, the determination

of the secondary structure of the protein did not reveal a change in the content of β -sheet. Corn masa with L-cysteine added, showed acceptable textural properties, and consequently, a good machinability is predicted, that may result in tortillas with good textural quality. However, it is necessary to make tortillas and to evaluate the textural changes that occur during storage, using objective and subjective methods as well sensory evaluation.

REFERENCES

- AACC. 2000. Approved Methods of Analysis, 11th ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA.
- Aguirre-Cruz, A., Mendez-Montevalvo, G., Solorza-Feria, J., Bello-Perez, L.A. 2005. Effect of carboxymethylcellulose and xanthan gum on the thermal, functional and rheological properties of dried nixtamalized maize masa. *Carbohydrate Polymers*. 62: 222-231.
- Angioloni, A., Rosa, M.D. 2007. Effects of cysteine and mixing conditions on white/whole dough rheological properties. *Journal of Food Engineering*. 80: 18-23.
- Arambula, V.G., Mauricio, S.R.A., Figueroa, C.J.D., Gonzalez-Hernandez, J., Ordorica, F.C.A. 1999. Corn masa and tortillas from extruded instant corn flour containing hydrocolloids and lime. *Journal of Food Science*. 64: 120-124.
- Argos, P., Pedersen, K., Marks, M.D., Larkins, B.A. 1982. A structural model for maize zein proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 257: 9984-9990.
- Bandekar, J. 1992. Amides modes and protein conformation. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1120: 123-143.
- Barth, A., Zscherp, C. 2002. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35: 369-430.
- Barth, K.H., Strandberg, J.D., Starr, F.L., Samphilipo, M.A., Anderson, J.H. 1984. Organ ablation by fluid emboli. An experimental study comparing two solidifying liquids. *Investigative Radiology*. 19: 517-522.
- Bean, S.R., Lyne, R.K., Tilley, K.A., Chung, O.K., Lookhart, G.L. 1998. A rapid method for quantitation of insoluble polymeric proteins in flour. *Cereal Chemistry*. 75: 374-377.
- Bloksma, A.H. 1990. Dough structure, dough rheology and baking quality. *Cereal Foods World*: 35: 237-244.
- Bloksma, A.H.a.B., W. 1988. Rheology and chemistry of dough. In. *Am. Assoc. Cereal Chem.*, St. Paul, MN.
- Campas-Baypoli, O.N., Rosas-Burgos, E.C., Torres-Chavez, P.I., Ramirez-Wong, B., Sonora, H., Serna-Saldivar, S.O. 1999. Physicochemical changes of starch during maize tortilla production. *Starch-Starke*. 51: 173-177.
- Chaidez-Laguna, L.D., Torres-Chavez, P., Ramirez-Wong, B., Marquez-Rios, E., Islas-Rubio, A.R., Carvajal-Millan, E., 2016. Corn proteins solubility changes during extrusion and traditional nixtamalization for tortilla processing: A study using size exclusion chromatography. *Journal of Cereal Science*. 69: 351-357.
- Elkhalifa, A.E.O., El-Tinay, A.H. 2002. Effect of cysteine on bakery products from wheat-sorghum blends. *Food Chemistry*. 77: 133-137.
- Gomez, O., S., Gomez, R., S.E., Cifuentes. 2005. Efecto de la L-cisteína y α -amilasa en la fuerza, tenacidad y extensibilidad de una masa panaria. *Vidsupra*. 1: 12-17.
- Gys, W., Courtin, C.M., Delcour, J.A. 2004. Reduction of xylanase activity in flour by debranching retards syringing in refrigerated doughs. *Journal of Cereal Science*. 39: 371-377.
- Joye, I.J., Lagrain, B., Delcour, J.A. 2009. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking-A review. *Journal of Cereal Science*. 50: 11-21.
- Koh, B.K., Karwe, M.V., Schaich, K.M. 1996. Effects of cysteine on free radical production and protein modification in extruded wheat flour. *Cereal Chemistry*. 73: 115-122.
- Lending, C.R., Kriz, A.L., Larkins, B.A., Bracker, C.E. 1988. Structure of maize protein bodies and immunocytochemical localization of zeins. *Protoplasma*. 143: 51-62.
- Li, M., Lee, T.C. 1996. Effect of extrusion temperature on solubility and molecular weight distribution of wheat flour proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 763-768.
- Matsushima, N., Danno, G., Takezawa, H., Izumi, Y. 1997. Three-dimensional structure of maize alpha-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. *Biochim Biophys Acta*. 1339: 14-22.
- Solano-Perez, J. R. Gruma: Inicio de cobertura. Monex.com.mx. [https://www.monex.com.mx/portal/download/reportes/Inicio%20de%20Cobertura%20de%20Gruma%20\(Septiembre%202018\).pdf](https://www.monex.com.mx/portal/download/reportes/Inicio%20de%20Cobertura%20de%20Gruma%20(Septiembre%202018).pdf). Consultado en Julio de 2021.
- Moreno-Rivas, S.C., Medina-Rodriguez, C.L., Torres-Chavez, P.I., Ramirez-Wong, B., Platt-Lucero, L.C. 2014. Changes in the solubility of corn proteins through interaction with the arabinoxylans in extruded nixtamalized corn flour treated with xylanase. *Plant Foods for Human Nutrition*. 69: 148-154.
- Platt-Lucero, L.C., Ramirez-Wong, B., Torres-Chavez, P.I., Lopez-Cervantes, J., Sanchez-Machado, D.I., Carvajal-Millan, E., Martinez-Bustos, F., Quintero-Ramos, A., Morales-Rosas, I. 2013. Effect of xylanase on extruded nixtamalized corn flour and tortilla: Physicochemical and rheological characteristics. *Journal of Food Process Engineering*. 36: 179-186.
- Platt-Lucero, L.C., Ramirez-Wong, B., Torres-Chavez, P.I., Lopez-Cervantes, J., Sanchez-Machado, D.I., Reyes-Moreno, C., Milan-Carrillo, J., Morales-Rosas, I. 2010. Improving textural characteristics of tortillas by adding gums during extrusion to obtain nixtamalized corn flour. *Journal of Texture Studies*. 41: 736-755.
- Popineau, Y., Huchet, B., Larre, C., Berot, S. 2002. Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*. 35: 327-335.
- Quintanar-Guzman, A.Q., Flores, M.E.J., Feria, J.S., Montevalvo, M.G.M., Wang, Y.J. 2011. Rheological and thermal properties of masa as related to changes in corn protein during nixtamalization. *Journal of Cereal Science*. 53: 139-147.
- Ramirez-Wong, B., Sweat, V.E., Torres, P.I., Rooney, L.W. 1994. Cooking time, grinding, and moisture content effect on fresh corn masa texture. *Cereal Chemistry*. 71: 337-343.
- Srinivasan, M., Waniska, R.D., Rooney, L.W. 2000. Note. Effects of ingredients and processing on dough rheology of wheat flour tortillas. *Food Science and Technology International*. 6: 331-338.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. 1988. New insight into protein secondary structure from resolution enhanced infrared spectra. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 952: 115-130.
- Wellner, N., Belton, P.S., Tatham, A.S. 1996. Fourier transform IR spectroscopic study of hydration-induced structure changes in the solid state of omega-gliadins. *Biochemical Journal*. 319: 741-747.

Effect of substrates on the kefir grain biomass production and antioxidant activity

Efecto de los sustratos en la producción de la biomasa de los granos de kéfir y la actividad antioxidante

Altamirano-Carranza AS¹, Tejeda-Mansir A², Noriega-Rodríguez JA¹, del Toro Sánchez CL³, Rodríguez-Figueroa JC^{1*}

¹ Food Engineering laboratory, Department of Chemical Engineering, University of Sonora. Hermosillo. CP 83000. Mexico.

² Department of Scientific and Technological Research, University of Sonora. Hermosillo. C.P. 83000. Mexico.

³ Department of Research in Food Science, University of Sonora. Hermosillo, 83000, Mexico.

ABSTRACT

Kefir is a fermented milk with proven bioactivities and popularity worldwide. However, kefir grains biomass (KGB) limits its production. The present work investigated the effect of different substrates on the KGB increase and antioxidant activity (AC). Kefir grains were inoculated (9.0 ± 0.7 g/L) into nonfat goat milk (GMK), nonfat goat milk with brown sugar (GMBSK), cow (1 % fat) milk (CMK), and cow milk brown sugar (CMBSK). Fermentation of substrates was at 25 ± 3 °C, and stopped at ~ 4.7 pH. Sampling was at 0, 4 and 8 h incubation time, evaluating KGB kinetics, productivity, growth rate parameters, physicochemical composition changes, and antioxidant activity. Goat milk substrates kefir had the highest AC values. GMBSK and GMK had 44.8 ± 1.4 % and 37.6 ± 3.6 % AC, respectively. GMK and GMBSK had the highest biomass increments, 147 ± 23 % and 136 ± 7 %, respectively. Also, GMK had the highest ($p < 0.01$) kefir grains biomass productivity, 2.49 ± 0.24 g/(L-h). Goat milk substrate has the potential to increase kefir grains biomass and to improve the bioactivity of kefir beverages.

Keywords: kefir, substrates, antioxidant activity, kefir grain biomass.

RESUMEN

El kéfir es una bebida láctea fermentada con bioactividades demostradas. Sin embargo, la biomasa de los granos de kéfir (KGB) limita su producción. En **éste** trabajo se evaluó el efecto de diferentes sustratos en la KGB y la actividad antioxidante (AC). Los granos de kéfir fueron inoculados (9.0 ± 0.7 g/L) en leche de cabra (GMK), GMK con azúcar morena (GMBSK), leche de vaca (CMK), y CMK con azúcar morena (CMBSK). La fermentación se realizó a 25 ± 3 °C y fue detenida a pH 4.7, aproximadamente. Las muestras se tomaron a las 0, 4 y 8 h de incubación. Las cinéticas del incremento de KGB, parámetros del crecimiento microbiano y actividad antioxidante fueron evaluadas. Los kéfirs elaborados con leche de cabra presentaron los valores de AC más altos. GMBSK y GMK tuvieron 44.8 ± 1.4 % y 37.6 ± 3.6 % AC, respectivamente. GMK y GMBSK tuvieron los mayores incrementos de biomasa, 147 ± 23 % y 136 ± 7 %, respectivamente. Además, GMK tuvo la productividad de KGB más elevada ($p < 0.01$), 2.49 ± 0.24 g/(L-h). La leche de cabra representa un sustrato alternativo

con potencial para incrementar la KGB y la AC en la bebida de kéfir.

Palabras clave: kéfir, sustratos, actividad antioxidante, biomasa de los granos de kéfir.

INTRODUCTION

Kefir grains are a symbiotic group of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, and yeast microorganisms embedded in an exopolysaccharide matrix. Traditionally, these microbial diversities use lactose from milk mainly as a source of carbon. However, external carbon sources to the medium for kefir manufacturing may represent a key role in increasing kefir grain biomass and obtaining biologically active compounds (Gradova et al., 2015; Maeda et al., 2004). For example, selected kefir cultures can synthesize different amounts of exopolysaccharide depending on the carbon source (Gradova et al., 2015). Also, it has been reported that sucrose is the main carbohydrate used by kefir grains to grow in soy milk (Gamba et al., 2020). On the other hand, the recognition of milk as an excellent substrate is due to the high quality and quantity of nutrients. There are reports on the chemical composition differences between cow and goat milk. In the last years, goat milk has gained attention because it has easier digestibility, softer curd formation, a higher proportion of small milk fat globules, and less allergenic properties than cow milk (Clark and Mora García, 2017). Recently, cow milk kefir has demonstrated health benefits such as improving cognitive deficits in Alzheimer's disease, anticancer, angiotensin-converting enzyme inhibition, and bactericidal and antioxidant activities (Fatahi et al., 2021; Ton et al., 2020). However, traditional kefir production amount is limited by the quantity of kefir grains inoculated. So, using different substrates may be one of the most important strategies to increase kefir grains biomass (Guzel-Seydim et al., 2011). Therefore, this research aimed to study the effect of substrates on the kefir biomass parameters and antioxidant activity of kefir beverages during traditional manufacturing procedures.

*Autor para correspondencia: José Carlos Rodríguez-Figueroa
Correo electrónico: jose.rodriguez@unison.mx

Recibido: 17 de noviembre de 2021

Aceptado: 18 de enero de 2022

MATERIALS AND METHODS

Kefir culture, media, and chemicals

Propagation of Kefir grains, collected from the Central part of Mexico, was done at the laboratory of Food Engineering, Department of Chemical Engineering and Metallurgy, University of Sonora. Purchase of Brown sugar and ultra-high temperature (UHT) skimmed cow milk (containing 3 % protein, 1% fat, 4.7 % carbohydrates, and 0.12 % calcium) was at a local supermarket (Super del Norte, Hermosillo, Mexico), while Nonfat goat milk powder (containing 16 % protein, 0 % fat, and 4 % carbohydrates) was from U.S.A. Analytical grade reagents and chemicals were all from Sigma (St. Louis MO, U.S.A.).

Kefir grains activation

The inactivated kefir grains (432 g) were inoculated into UHT skimmed cow's milk (750 mL) and incubated at 25 ± 3 °C for 24 h without stirring. The grains were retrieved by sieving and rinsed with distilled water (Kilic *et al.*, 2016). This procedure was repeated for 5 weeks to activate the grains (Demirhan *et al.*, 2013).

Fermentation

To obtain fermented milk by kefir grains, we followed traditional conditions. The activated grains (9.0 ± 0.7 g/L) were inoculated into reconstituted (10 %, p/v) pasteurized goat milk (GM), GM + brown sugar solution (GMBS), UHT skimmed cow milk (CM) and CM + brown sugar solution (CMBS) media. Commercial brown sugar was dissolved in distilled water (50 %, w/v), sterilized, and added at 3 % (v/v). Fermentation was under ambient atmospheric conditions at 25 ± 3 °C using an incubator (G-25, New Brunswick Scientific, NJ, U.S.A.) with constant rotary agitation (100 rpm). Samples were isolated at 0, 4, and 8 h incubation time once they have reached pH 4.6 (Satir and Guzel-Seydim, 2015a).

Biomass production

Kefir grains biomass were separated using a plastic sieve. The filtrated corresponded to the kefir beverage. Kefir beverage samples were frozen at -80 °C for further analysis (Demirhan *et al.*, 2011). Kefir grains biomass was washed with distilled water and centrifuged (Allegra X-22R, Beckman Coulter, Germany) at $2,716 \times g$ for 15 min at 25 °C. The biomass increment (g/L) was quantified gravimetrically by convective thermal drying at 38 °C until constant weight (Papapostolou *et al.*, 2008), and results expressed as g/L. Kefir grains biomass productivity was obtained considering each fermentation time. Specific growth rate (μ) and doubled time parameters were calculated from the following Gompertz equation (Tramšek and Goršek, 2008):

$$\frac{X}{X_0} = \mu_{max} \exp[-\exp(b - ct)] \quad (1)$$

Where X and X_0 are the concentration of kefir grain biomass (g/L) at the beginning of the experiment and at the experimental time (h), respectively. μ_{max} is the maximum spe-

cific rate of the culture (h^{-1}), b is a dimensionless parameter, c is a model parameter (h^{-1}) and t is time (h).

Physico-chemical analyses

Total solids (Official Methods of Analysis. Method 925.23.A.O.A.C. International., 2012) and protein (Bradford, 1976) physicochemical analyses were done through kefir fermentation time.

Mathematical modeling of pH

Values of pH (Tarango-Hernández *et al.*, 2015) kefir beverages were monitored during fermentation time through a 5 mL aliquot (Star 3 Orion, Thermo Scientific, Singapore). Experimental pH data was analyzed using a Logistic mathematical model represented by the following equation (Kaptan *et al.*, 2015):

$$\frac{pH_t - pH_{inf}}{pH_0 - pH_{inf}} = 10^{kt} \quad (2)$$

Where pH_t is the pH at the experimental time, pH_{inf} is the pH after infinite time, pH_0 is the pH at time = 0, k is the lumped specific rate of the reaction (h^{-1}), and t is time (h).

Kefir samples preparation

Kefir beverage samples were centrifuged twice at $15,000 \times g$ for 30 min at 4 °C, (Biofuge Stratos, Sorvall, Germany) to remove fat, and then freeze-dried (Freezone 4.5, U.S.A.) for further analyses, once milled in a mortar and resuspended in distilled water (0.1 %, w/v).

Antioxidant capacity (AC)

Kefir AC was assessed by the 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) scavenging assay (Re *et al.*, 1999). Water extracts were prepared by centrifuging kefir samples at $9,561 \times g$ for 10 min at 4 °C. ABTS stock solution (7.0 mM) oxidation was in water added with potassium persulfate (2.45 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) buffer. ABTS⁺ was prepared to keep the mixture for 12-16 h at room temperature in the dark, diluted in ethanol (99.9 %) to yield 0.7 ± 0.02 absorbance at 734 nm using a Fluostar spectrophotometer (B.M.G. Labtech, Germany). A 20 μ L water extract aliquot was added to 280 μ L ABTS⁺ solution. After 15 min of the reaction in the dark, we measured kefir antioxidant compounds' scavenging capacity by decreasing absorbance at the same wavelength. The absorbance of the ethanol ABTS⁺ solution without sample was the control; meanwhile, the solvent was the blank. The kefir AC expression was as the percentage of ABTS⁺ scavenging according to the following equation:

$$ABTS \text{ Radical scavenging capacity } \% = \frac{Absorbance_{Control} - Absorbance_{Sample}}{Absorbance_{Control}} \times 100 \quad (3)$$

Statistical analysis

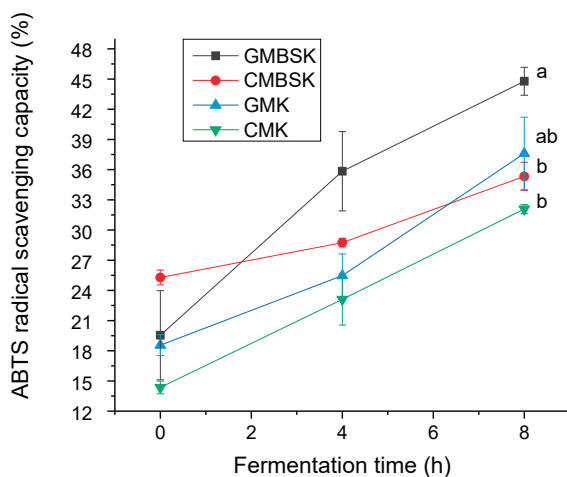
All experiments were repeated three independent times, samples analyzed in triplicate, and all results expressed as the mean value \pm standard deviation (SD). Generalized

lineal model (GLM) analysis of variance (ANOVA) was used to find differences between means at $\alpha = 0.01$ significant level. Significant differences between means were determined by the Tuckey-Kramer test ($p < 0.01$). All statistical analysis was performed using the NCSS 2012 statistical program (NCSS Inc., Kaysville, UT, U.S.A.).

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant capacity of kefir beverages

The kefir beverages AC was determined as percentage free ABTS radical scavenging. All beverages' substrates inoculated by kefir grains presented AC during fermentation time (Figure 1). Goat milk substrates kefir had the highest AC values; Goat milk brown sugar (GMBSK) and goat milk (GMK) had 44.8 ± 1.4 % and 37.6 ± 3.6 % AC, respectively. In contrast, cow milk brown sugar kefir (CMBSK) had 35.3 ± 1.4 % AC; meanwhile, cow milk substrate kefir (CMK) had 32.1 ± 0.5 % A.C. Both kefir AC values were significantly lower ($p < 0.01$) than GMBSK at 8 h of fermentation time. Other study found that goat milk inoculated by *Limosilactobacillus fermentum* presented 17.6 ± 1.3 % AC after 12 h fermentation time (Panchal, Hati, and Sakure, 2019). Yilmaz-Ersan *et al.* (2016), reported 13.03 ± 0.04 % AC in goat milk inoculated with 5 % (v/w) kefir grains and incubated for 8 h without agitation. Moreover, Satir and Guzel-Seydim (2015) also found significantly higher ($p < 0.05$) AC values in kefir using goat milk as substrate ($6.38 \mu\text{M}$ Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity [TEAC]) than cow milk ($5.46 \mu\text{M}$ TEAC). In fact, they found 14 % higher AC in GMK than in CMK; meanwhile, in this study GMBSK had 13 % higher AC than CMK. They reported that goat milk kefir AC was related to the highest ($p < 0.05$) fat (5.56 ± 0.13 g/100 g) and protein (4.79 ± 0.38 g/100 g) concentrations. However, in this study goat milk was nonfat; the highest ($p < 0.01$) protein content (3.19 ± 0.01 g/100 g) at 8 h fermentation time was



^{a, b} Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.01$). Data represent the mean values \pm SD ($n = 3$). GMBSK= Goat milk brown sugar kefir; CMBSK= Cow milk brown sugar kefir; GMK= Goat milk kefir; CMK= Cow milk kefir.

Figure 1. Effect of substrates on the antioxidant capacity of kefir beverages.
Figura 1. Efecto de los sustratos en la capacidad antioxidante del kéfir.

also found in GMBSK (Table 1). Furthermore, GMBSK data analyses suggested a direct association between protein content reduction and AC percentage increase (correlation coefficient = - 0.96) during fermentation time. Previous reports have suggested that the chemical composition of milk, such as fat, protein (Zulueta *et al.*, 2009), and phenolic compounds (Satir and Guzel-Seydim, 2015), play a key role in the kefir AC. Few differences have been reported between cow and goat milk chemical compositions. Goat milk has a higher proportion of short-medium fatty acids, lack of β -carotene, higher levels of β -casein (CN), and lower levels of α_{s1} -CN, compared with cow milk (Park *et al.*, 2007). Indeed, goat milk casein differs significantly from cow milk casein in peptide chain length and amino acid sequences (Ceballos *et al.*, 2009). However, a significant total phenolic content has been reported to decrease during fermentation and storage (Yilmaz-Ersan *et al.*, 2016).

Table 1. Changes in total solids and protein content of kefir beverages during fermentation time.

Tabla 1. Cambios en los contenidos de sólidos totales y proteína en el kéfir durante el tiempo de fermentación.

| Fermentation time (h) | Kefir treatments | | | | |
|-----------------------|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | GMBSK | CMBSK | GMK | CMK | |
| Protein (g/100g) | 0 | 3.71 \pm 0.02 ^b | 3.58 \pm 0.01 ^b | 3.96 \pm 0.01 ^a | 3.95 \pm 0.08 ^a |
| | 4 | 3.44 \pm 0.02 ^b | 3.31 \pm 0.01 ^c | 3.43 \pm 0.01 ^b | 3.72 \pm 0.00 ^a |
| | 8 | 3.19 \pm 0.01 ^a | 2.95 \pm 0.01 ^b | 2.97 \pm 0.01 ^b | 2.97 \pm 0.02 ^b |
| Total solids (g/100g) | 0 | 6.17 \pm 0.70 ^a | 5.95 \pm 0.07 ^a | 6.03 \pm 0.42 ^a | 5.64 \pm 0.37 ^a |
| | 4 | 6.64 \pm 0.65 ^a | 5.60 \pm 0.67 ^a | 5.24 \pm 0.13 ^a | 5.91 \pm 0.23 ^a |
| | 8 | 6.01 \pm 0.43 ^b | 5.70 \pm 0.03 ^b | 5.82 \pm 0.25 ^b | 7.43 \pm 0.27 ^a |

^{a, b, c} Different superscript letters within a row indicate significant differences ($p < 0.01$).

Data represent the mean values \pm SD ($n = 3$). GMBSK= Goat milk brown sugar kefir; CMBSK= Cow milk brown sugar kefir; GMK= Goat milk kefir; CMK= Cow milk kefir.

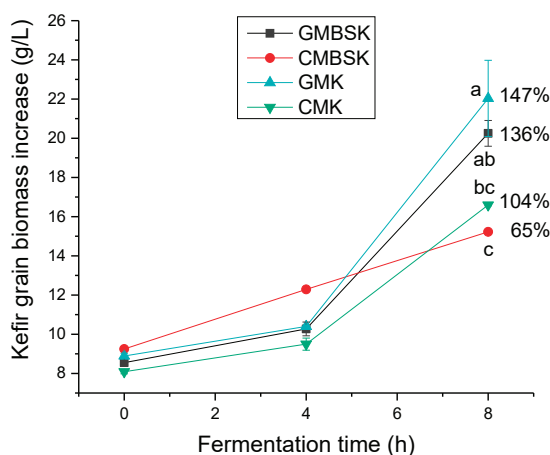
Milk fermentation by kefir microorganisms increased the AC due to their metabolic activity (Liu *et al.*, 2005). Indeed, in this study the maximum AC increase was 130 \pm 2.5 %, which was observed in the GMBSK beverage. Studies have demonstrated the ability of these microorganisms to produce secondary metabolites as bioactive compounds (Kaptan, Kayisoglu, and Oksuz, 2015). Previously, the proteomic analysis identified 2,328 peptides belonging to 32 protein entities in goat milk kefir (Izquierdo-González *et al.*, 2019), while more than 1500 peptides were derived from 27 proteins were found in cow milk kefir (Dallas *et al.*, 2016). The highest amount of peptides was released from goat milk β -casein fraction, with 846 peptides (Izquierdo-González *et al.*, 2019). Therefore, kefir microorganisms' proteolytic activity releases peptides sequences with potential bioactivity such as antioxidant activity (Yilmaz-Ersan *et al.*, 2016).

The addition of brown sugar to milk kefir culture media and its effect on the AC has been scarcely evaluated. Results suggested that brown sugar increased the AC in all treatments. However, the increments were not significantly different ($p > 0.01$) between substrates with the same type of milk. According to Hsieh *et al.* (2012), the modification of kefir fermentation media has been associated with remarkable changes in microbial ecological profiles, mainly in lactic acid bacteria and their metabolites.

Kefir grains biomass increase

All substrates increased kefir grains biomass during fermentation time (Figure 2). After 8 h of incubation time, GMK and GMBSK had the highest biomass increments, 147 ± 23 % and 136 ± 7 %, respectively. On the other side, CMK and CMBSK increased 104 ± 3 % and 65 ± 1 %, respectively. Therefore, goat milk substrates kefir also influenced kefir biomass production positively. GMK and CMK had the highest protein content ($p < 0.01$) at the beginning of the fermentation, 3.96 ± 0.01 g/100 g and 3.95 ± 0.08 g/100 g, respectively (Table 1). A previous study reported that substrates with higher protein content presented the highest biomass increment after 28 days of fermentation (Guzel-Seydim *et al.*, 2011). However, not only the protein content may be related to kefir biomass increment. Indeed, changes in the chemical composition of fermentation media, such as vitamins, minerals, and carbohydrates, may affect the kefir grains metabolism (Demirhan *et al.*, 2013). For example, data suggested that the addition of brown sugar to the medium reduced biomass generation at the end of the fermentation time. Remarkable changes have been reported in microbial ecological profiles of lactic acid bacteria in sugary kefir grains and their filtrates, when brown sugar and goat or cow milk are used as substrates (Hsieh

et al., 2012). According to Seydim *et al.* (2011), nonfat cow milk inoculated with kefir grains (2 %, w/v) and incubated at 25°C for 30 days had a 98.5% biomass increment (Guzel-Seydim *et al.*, 2011). Schoevers & Britz (2003) inoculated milk (20 g/L fat) with kefir grains (2 %, w/v) and fermented at 25°C for 24 h, resulting in a biomass increase of 145 % (Schoevers and Britz, 2003). Kefir grains biomass increase data collected during experimental fermentation time in mathematical modeling. Gompertz model has been demonstrated to accurately describe the classical growth curve and predict an optimal curve of kefir grains (Goršek and Tramšek, 2008). Results from fitting the predictive Gompertz growth model to the experimental data of kefir grains biomass increase in different substrates, are shown in Table 2. The highest maximum growth rate (μ_{max}) and the lowest doubled time values were presented by GMK, 0.101 ± 0.014 h⁻¹, and 6.80 ± 0.9 h, respectively. In contrast, CMBSK had the lowest μ_{max} and the highest doubled time values ($p < 0.01$) 0.046 ± 0.005 h⁻¹, and 14.90 ± 0.40 h. Therefore, kefir grains biomass growth rate may be affected by cow milk and brown sugar substrates. Goršek and Tramšek (2008) reported $\mu_{max} = 0.022 \pm 0.003$ h⁻¹ with full fat cow milk added with glucose (20 g/L), inoculated with kefir grains (75 g/L) and incubated at 24°C for 36 h. Besides, the specific growth rate of lactobacilli species linearly decreased with the increment in sugars in liquid growth media. This effect was associated with the osmotic stress exerted by the sugars on the bacteria (Narendranath and Power, 2005). Several studies have reported the dominance of lactobacilli strains in kefir grains microorganisms (Izquierdo-González *et al.*, 2019; Yilmaz-Ersan *et al.*, 2016). On the other hand, it has been reported that full fat cow milk inoculated (42 g/L) with kefir grains and fermented at 21°C for 89 h presented $\mu_{max} = 0.042 \pm 0.003$ h⁻¹ (Zajsek and Gorsefe, 2009). Kefir beverage is traditionally prepared inoculating kefir grains in milk; hence its productivity was also evaluated. Results showed that all substrates presented kefir grains biomass productivity at the end of the fermentation time (Figure 3). GMK had the highest ($p < 0.01$) kefir grains biomass productivity, 2.49 ± 0.24 g/(L-h), meanwhile CMBSK presented the lowest values ($p < 0.01$), 1.32 ± 0.02 g/(L-h). Results suggested that the kind of milk



^{a, b, c} Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.01$). Data represent the mean values ± SD of ($n = 3$). GMBSK= Goat milk brown sugar kefir; CMBSK= Cow milk brown sugar kefir; GMK= Goat milk kefir; CMK= Cow milk kefir.

Figure 2. Effect of substrate on kefir grain biomass increase.

Figura 2. Efecto de los sustratos en el incremento de la biomasa de los granos de kéfir.

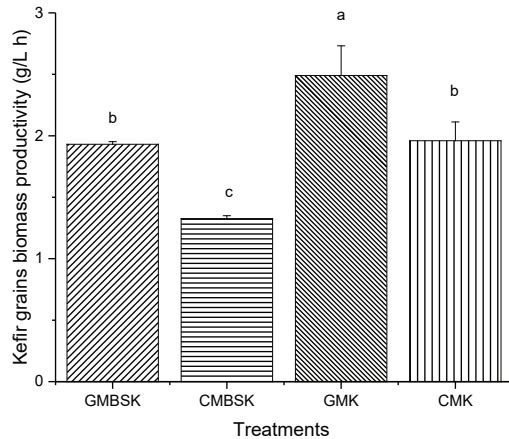
Table 2. Results from fitting experimental data of kefir grains inoculated in different substrates to the predictive Gompertz growth model.

Tabla 2. Resultados de la aplicación del modelo matemático de Gompertz a los datos experimentales derivados de la inoculación de los granos de kéfir en diferentes sustratos.

| Treatment | Maximum growth rate (μ_{max} , h ⁻¹) | Doubled time (h) | R ² |
|-----------|---|--------------------------|----------------|
| GMBSK | 0.082 ± 0.005 ^b | 8.48 ± 0.5 ^a | 0.99 |
| CMBSK | 0.046 ± 0.001 ^c | 14.90 ± 0.4 ^b | 0.99 |
| GMK | 0.101 ± 0.014 ^{ab} | 6.80 ± 0.9 ^a | 0.99 |
| CMK | 0.095 ± 0.006 ^a | 7.30 ± 0.7 ^a | 0.99 |

^{a, b, c} Different superscript letters within a column indicate significant differences ($p < 0.01$).

Data represent the mean values ± SD ($n = 3$). GMBSK= Goat milk brown sugar kefir; CMBSK= Cow milk brown sugar kefir; GMK= Goat milk kefir; CMK= Cow milk kefir.



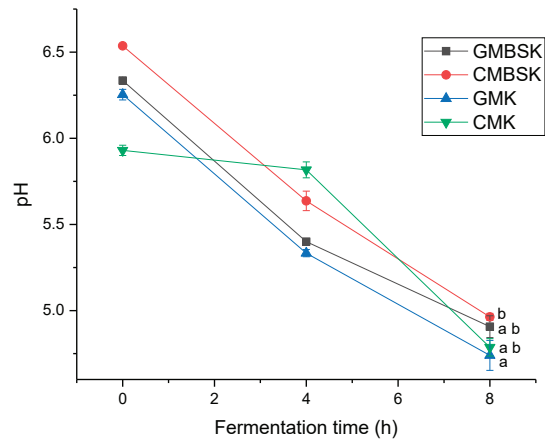
^{a, b, c} Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$). Data represent the mean values \pm SD ($n = 3$). GMBSK= Goat milk brown sugar kefir; CMBSK= Cow milk brown sugar kefir; GMK= Goat milk kefir; CMK= Cow milk kefir.

Figure 3. Effect of substrate on kefir grain biomass productivity.
Figura 3. Efecto del sustrato en la productividad de la biomasa de los granos de kéfir.

and the media chemical composition, such as the addition of brown sugar, may play a key role in the kefir biomass productivity.

Effect of substrates on pH decrease

Changes in kefir beverages pH associated with substrates were evaluated during fermentation time. Initially, goat and cow milk's pH values were 6.3 ± 0.1 and 6.6 ± 0.2 , respectively. According to the manufacturer's information, kefir beverage fermentation stops at pH 4.7 (Savastano *et al.*, 2020). This pH value was reached by most of the kefir beverages at 8 h of fermentation time (Figure 4). GMK presented significant lower ($p < 0.01$) pH values (4.74 ± 0.08) than CMBSK (4.96 ± 0.02). Whole cow milk inoculated with 5 % (w/v) kefir grains from different places, in static conditions, presented a 4.57- 5.27 pH values range after 24 h of fermentation time (Korsak *et al.*, 2015). Kefir grains are constituted by a consortium of symbiotic microorganisms, mainly bacteria such as lactic acid, acetic acid, bifidobacteria, and yeasts with different nutritional requirements (Wawrzyniak *et al.*, 2019). Yeasts' production of pyruvate, carbon dioxide, propionate, succinate, vitamins, and amino acids stimulates lactic acid bacteria metabolic activity, decreasing pH by generating organic acids (Álvarez-Martín *et al.*, 2008). The pH kinetic values of kefir beverages were mathematically modeled using the Logistic equation (Table 3). There were no statistical differences ($p > 0.01$) between the lumped specific pH rates. However, GMBSK had the lowest lumped specific pH rate value, $0.033 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$, while CMBSK had the highest value, $0.050 \pm 0.000 \text{ h}^{-1}$. A previous study reported that skimmed cow milk kefir fermented during 10 h had 0.048 h^{-1} specific pH rate value. Therefore, kefir beverage's pH decrease was not clearly affected by kefir substrates.



^{a, b, c} Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$). Data represent the mean values \pm SD ($n = 3$). GMBSK= Goat milk brown sugar kefir; CMBSK= Cow milk brown sugar kefir; GMK= Goat milk kefir; CMK= Cow milk kefir.

Figure 4. Effect of substrate on kefir beverages pH.
Figura 4. Efecto del sustrato en el pH del kéfir.

Table 3. Results from fitting experimental pH data of kefir grains inoculated in different substrates using Logistic mathematical model.

Tabla 3. Resultados de la aplicación del modelo matemático Logístico a los datos experimentales de pH derivados de la inoculación de los granos de kéfir en diferentes sustratos.

| Treatment | Lumped specific rate of reaction (h^{-1}) | R ² |
|-----------|--|----------------|
| GMBSK | 0.033 ± 0.005^a | 0.95 |
| CMBSK | 0.048 ± 0.011^a | 0.95 |
| GMK | 0.046 ± 0.018^a | 0.94 |
| CMK | 0.050 ± 0.000^a | 0.98 |

^{a, b, c} Different superscript letters within a column indicate significant differences ($p < 0.01$). Data represent the mean values \pm SD ($n = 3$). GMBSK= Goat milk brown sugar kefir; CMBSK= Cow milk brown sugar kefir; GMK= Goat milk kefir; CMK= Cow milk kefir.

CONCLUSIONS

This study suggests that kefir beverage substrates play a key role in antioxidant activity, pH decrease, and kefir grain biomass increase. Goat milk was the substrate associated with the highest kefir beverage antioxidant activity, and kefir grain biomass productivity. On the other hand, brown sugar substrate significantly reduced the parameters of kefir grains biomass increase. The Gompertz and Logistic models adequately modeled the variation of kefir biomass production and pH kefir beverages variation. Therefore, kefir substrates selection and modeling may be a relevant strategy to increase grains biomass and bioactivity of these beverages and develop a cost-effective bioprocess. Nevertheless, *in vivo* studies and metabolomic analyses are needed to determine the molecular mechanisms of action of all active substances present in kefir beverages recognized as health promoters.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank Takeko Kamiwaki for kindly giving us kefir grains and CONACYT support through project 258483.

REFERENCES

- Álvarez-Martín P, Flórez AB, Hernández-Barranco A and Mayo B (2008) Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control* 19(1): 62–70. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713507000357> (accessed 02/03/15).
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP and Sampelayo MRS (2009) Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis* 22(4): 322–329.
- Clark S and Mora García MB (2017) A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science* 100(12): 10026–10044.
- Dallas DC, Citerne F, Tian T, Silva VLM, Kalanetra KM, Frese SA, Robinson RC, Mills DA and Barile D (2016) Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chemistry* 197: 273–284.
- Demirhan E, Gürses B, Yalçın BE, Apar DK and Özbek B (2013) Influence of vitamin (B1, B6, B9, B12, C) and ions (Cu²⁺, Mn²⁺, PO₄³⁻) on kefir grain biomass growth. *Food Science and Biotechnology* 22(4): 1007–1013.
- Dermihan E, Kilic D, Payer G and Zbek O (2011) A modelling study on kefir grain biomass growth: Influence of various minerals. *Food Science and Technology* 64(3): 402–407.
- Fatahi A, Soleimani N and Afrough P (2021) Anticancer Activity of Kefir on Glioblastoma Cancer Cell as a New Treatment. *International Journal of Food Science* 1–5.
- Gamba RR, Yamamoto S, Abdel-Hamid M, Sasaki T, Michihata T, Koyanagi T and Enomoto T (2020) Chemical, Microbiological, and Functional Characterization of Kefir Produced from Cow's Milk and Soy Milk. *International Journal of Microbiology* 1–11.
- Goršek A and Tramšek M (2008) Kefir grains production—An approach for volume optimization of two-stage bioreactor system. *Biochemical Engineering Journal* 42(2): 153–158. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X08002143> (accessed 26/09/14).
- Gradova NB, Khokhlacheva AA, Murzina ED and Myasoyedova V V. (2015) Microbial components of kefir grains as exopolysaccharide kefiran producers. *Applied Biochemistry and Microbiology* 51(9): 873–880. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S0003683815090045>.
- Guzel-Seydim Z, Kok-Tas T, Ertekin-Filiz B and Seydim a C (2011) Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *Journal of dairy science* 94(3): 1239–1242.
- Hsieh H-H, Wang S-Y, Chen T-L, Huang Y-L and Chen M-J (2012) Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International journal of food microbiology* 157(1): 73–81. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512002036> (accessed 22/01/16).
- Izquierdo-González JJ, Amil-Ruiz F, Zazzu S, Sánchez-Lucas R, Fuentes-Almagro CA and Rodríguez-Ortega MJ (2019) Proteomic analysis of goat milk kefir: Profiling the fermentation-time dependent protein digestion and identification of potential peptides with biological activity. *Food Chemistry*. Elsevier 295: 456–465. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619309914> (accessed 17/09/19).
- Kaptan B, Kayisoglu S and Oksuz O (2015) Mathematical Modeling of pH Variation as a Function of Temperature and Time in Kefir Production. *American Journal of Food Science and Nutrition Research* 2(2): 57–61. Available at: <http://www.openscienceonline.com/journal/afsnr>.
- Kilic D, Ozel B and Ozbek B (2016) Kefir grain biomass production: Influence of different culturing conditions and examination of growth kinetic models. 1–9.
- Korsak N, Taminiau B, Leclercq M, Nezer C, Crevecoeur S, Ferauche C, Detry E, Delcenserie V and Daube G (2015) Short communication: Evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. *Journal of dairy science* 98(6): 3684–3689. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25828663>.
- Liu J-R, Lin Y-Y, Chen M-J, Chen L-J and Lin C-W (2005) Antioxidative Activities of Kefir. *Asian-Aust* 18(4): 567–573.
- Maeda H, Zhu X, Suzuki S, Suzuki K and Kitamura S (2004) Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(17): 5533–5538.
- Narendranath N V. and Power R (2005) Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2239–2243.
- Official methods of analysis. Method 925.23.A.O.A.C. International. (2012) A.O.A.C. International (19th ed.). Washington, D.C.
- Panchal G, Hati S and Sakure A (2019) Characterization and production of novel antioxidative peptides derived from fermented goat milk by *L. fermentum*. *LWT*. Academic Press 119: 108887. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819312290#bib3> (accessed 24/12/19).
- Papapostolou H, Bosnea L a., Koutinas A a. and Kanellaki M (2008) Fermentation efficiency of thermally dried kefir. *Bioresource Technology* 99(15): 6949–6956.
- Park YW, Juárez M, Ramos M and Haenlein GFW (2007) Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68(1–2): 88–113. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448806002549> (accessed 17/02/15).
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9–10): 1231–1237. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998003153> (accessed 12/07/14).
- Satir G and Guzel-Seydim ZB (2015a) Influence of Kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. *LWT - Food Science and Technology* 63: 852–858.

- Satir G and Guzel-Seydim ZB (2015b) Influence of Kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. *LWT - Food Science and Technology* 63(2): 852–858.
- Savastano ML, Pati S, Bevilacqua A, Corbo MR, Rizzuti A, Pischetsrieder M and Losito I (2020) Influence of the production technology on kefir characteristics: Evaluation of microbiological aspects and profiling of phosphopeptides by LC-ESI-QTOF-MS/MS. *Food Research International* 129: 108853.
- Schoevers A and Britz TJ (2003) Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *International Journal of Dairy Technology* 56: 183–187.
- Tarango-Hernández S, Alarcón-Rojo AD, Robles-Sánchez M, Gutiérrez-Méndez N and Rodríguez-Figueroa JC (2015) Short communication: Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of dairy science* 98(11): 7635–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215006475> (accessed 19/10/15).
- Ton AMM, Campagnaro BP, Alves GA, Aires R, Côco LZ, Arpini CM, Guerra E Oliveira T, Campos-Toimil M, Meyrelles SS, Pereira TMC and Vasquez EC (2020) Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1–14.
- Tramšek M and Goršek A (2008) Analysis of growth models for batch kefir grain biomass production in rc1 reaction system. *Journal of Food Process Engineering* 31(6): 754–767.
- Wawrzyniak J, Kaczyński ŁK, Cais-Sokolińska D and Wójtowski J (2019) Mathematical modelling of ethanol production as a function of temperature during lactic-alcoholic fermentation of goat's milk after hydrolysis and transgalactosylation of lactose. *Measurement*. Elsevier 135: 287–293. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263224118311242> (accessed 09/12/19).
- Yilmaz-Ersan L, Ozcan T, Akpınar-Bayazit A and Sahin S (2016) The Antioxidative Capacity of Kefir Produced from Goat Milk. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 7(1): 22–26. Available at: <http://www.ijcea.org/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=75&id=890>.
- Zajsek K and Gorsefe A (2009) IChemE Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. 8(June): 55–60.
- Zulueta A, Maurizi A, Frígola A, Esteve MJ, Coli R and Burini G (2009) Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal* 19(6–7): 380–385. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694609000314> (accessed 24/03/16).

Actividad de tres aceites esenciales sobre la mortalidad de *Rhyzopertha dominica* (F.) en trigo almacenado

Activity of three essential oils on the mortality of *Rhyzopertha dominica* (F.) in stored wheat

Iturralde-García RD¹, Borboa-Flores J¹, Sánchez-Maríñez RI², Cortez-Rocha MO¹, Cinco-Moroyoqui FJ¹ and Wong-Corral FJ^{1*}

¹ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.

² Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Rhyzopertha dominica (F.) es una plaga del trigo almacenado y para su control se usa indiscriminadamente sustancias químicas provocando resistencia a insectos, además de problemas ambientales y de salud. Por consiguiente, el objetivo fue evaluar el efecto de los aceites esenciales de *Melaleuca viridiflora* Gaertn, *Lippia palmeri* Watson y *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt sobre la mortalidad, repelencia, emergencia de *R. dominica*, y la pérdida de peso en trigo, saturando la atmósfera con diferentes concentraciones de aceites (0, 5, 10, y 15 µL/kg) y tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) sobre *R. dominica*. Los resultados mostraron actividad insecticida de los aceites quedando en el siguiente orden de importancia *M. viridiflora*, *E. camaldulensis* y *L. palmeri*. Existe una relación directamente proporcional en el parámetro de mortalidad con respecto al tiempo de exposición y la concentración de los aceites. De estos, el que mejor efecto exhibió fue *M. viridiflora* sobre la mortalidad de *R. dominica*, la emergencia de insectos adultos y la reducción en la pérdida de peso. Mientras, *L. palmeri* fue el que mejor repelencia presentó. Se concluye que los tres aceites esenciales presentan potencial actividad para el control de *R. dominica* disminuyendo la pérdida de peso en el grano.

Palabras clave: Plaga, Aceites esenciales, almacenamiento, trigo.

ABSTRACT

Rhyzopertha dominica (F.) is a stored wheat pest and its control uses indiscriminately chemical substances that causes resistance to insects, as well as environmental and health problems. Therefore, the objective was to evaluate the effect of the essential oils of *Melaleuca viridiflora* Gaertn, *Lippia palmeri* Watson, and *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt on mortality, repellency, *R. dominica* emergence, and weight loss in wheat, saturating the atmosphere with different oil concentrations (0, 5, 10, and 15 µL/kg) and exposure times (24, 48 and 72 h) on *R. dominica*. The results showed insecticidal activity of the oils and were arranged in the order of importance: *M. viridiflora*, *E. camaldulensis* and *L. palmeri*. There is a directly proportional relationship in the mortality parameter with respect to the oils exposure time and concen-

tration. Of these, the one that exhibited the best effect was *M. viridiflora* on the mortality of *R. dominica*, the emergence of adult insects and the reduction in weight loss. Whereas, *L. palmeri* showed the best repellency. It is concluded that the three essential oils have potential activity for the control of *R. dominica*, reducing the wight loss in the grain.

Keywords: Pest, essential oils, storage, wheat.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas importantes durante el almacenamiento de los granos de trigo son las pérdidas causadas por los insectos estimándose del 5 a 15% a nivel mundial (Nayak y Daglish, 2018). Entre las especies más comunes en cereales se encuentra *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Bostrichidae), que es una plaga cosmopolita primaria de desarrollo interno, es decir los adultos ponen los huevos en el exterior del grano y las larvas de primer estadio penetran y se desarrollan en el interior del grano hasta alcanzar el estado adulto que emerge del grano y se dispersa (Rees, 1995; Iturralde-García *et al.*, 2020). Los métodos de control de insectos durante el almacenamiento son de diferentes tipos, siendo el químico el más utilizado, donde su uso continuo y discriminado ha tenido un impacto ambiental negativo, incluyendo pérdidas de calidad de agua, contaminación del hábitat natural (como en el caso del uso de bromuro de metilo), resistencia de las especies que eran objeto de control (con el uso de fosfina), junto con problemas de seguridad y exposición del consumidor a los residuos de plaguicidas en el alimento, en el aire y en el suelo (Bouvier *et al.*, 2001). En la actualidad ha incrementado la demanda del consumidor por alimentos seguros, en el cual se han estado desarrollando métodos alternativos al control químico que son libres de residuos y que no produzcan daños en el medio ambiente para el control de insectos plagas de almacén. Uno de los métodos alternativos que han tomado relevancia es el uso de aceites esenciales debido a sus componentes que le confieren la función de tipo de insecticida natural (Batish *et al.*, 2008; Martínez-Evaristo *et al.*, 2015). En este contexto, los extractos y aceites esenciales se presentan hoy en todo el mundo, como una excelente alternativa ofreciendo, bi-disponibilidad, biodegradabilidad y selectividad. Diversos

trabajos documentan la bioactividad de estos compuestos frente a diferentes insectos plaga de almacén (Reyes-Guzmán *et al.*, 2012; Martínez-Evaristo *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Ghabbari *et al.*, 2018). Por lo anterior, el presente estudio es con el propósito de tener información y contribuir en la búsqueda de productos naturales que puedan controlar a *R. dominica* sin afectar la calidad del grano y evitar la pérdida de peso durante su almacenamiento. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los aceites esenciales de *Melaleuca viridiflora* Gaertn, *Lippia palmeri* Watson y *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt sobre la mortalidad, repelencia, emergencia de *R. dominica*, así como la pérdida de peso en trigo. *R. dominica*, y determinamos la pérdida de peso del trigo producido por el insecto con tres tipos de aceite esencial a diferentes dosis y periodos de exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron grano de trigo (*Triticum aestivum* L.) variedad tarachi. Los ejemplares de *Rhyzopertha dominica* provinieron de una colonia desarrollada en el laboratorio de Entomología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora. La colonia se desarrolló bajo condiciones controladas de temperatura (27 ± 2 °C), humedad relativa (70 ± 5 %) y fotoperiodo (12L:12O). Después de siete días durante los cuales se llevó a cabo la oviposición, los insectos progenitores fueron removidos y los granos infestados se mantuvieron en incubación por 45 días adicionales para la emergencia de nuevos insectos. La progenie resultante fue empleada para infestar las muestras de grano de trigo que se expusieron a los aceites esenciales.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales utilizados fueron *Melaleuca viridiflora* Gaertn (Myrtales: Myrtaceae) obtenido del comercio local de la marca Soria natural distribuidos por la casa Herbofarm Madrid, España; *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt (Myrtales: Myrtaceae) obtenido de hoja recolectada de árboles ubicados a 29° 00' 44" N y 111° 08' 02" O; y orégano *Lippia palmeri* Watson (Verbenaceae) en 29° 02' 52" N y 110° 50' 16" O.

Extracción de los aceites esenciales en hoja

El aceite esencial fue extraído mediante el proceso de destilación por arrastre de vapor de agua siguiendo el Método Oficial de la A.O.A.C. 6.006 (Association of Official Analytical Chemists 1975), para lo cual se utilizó un destilador tipo Clevenger de capacidad de 2 L donde se colocaron 100 gramos de hojas de las plantas que fueron recolectadas de *E. camaldulensis* y *L. palmeri*, cortadas a mano en partículas pequeñas de 2 cm. Una vez obtenidos los aceites se almacenaron en viales color ámbar a 4 °C para su conservación.

Mortalidad de *R. dominica*

Se realizaron pruebas *in vitro* por saturación atmosférica para lo cual se añadieron 10 adultos de *R. dominica* de edades estandarizadas (10 días) con 5 g de trigo y se impreg-

naron discos de papel filtro de 2 cm de circunferencia con concentraciones de 5, 10 y 15 $\mu\text{L}/\text{kg}$ para cada aceite esencial y a tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h), en cajas Petri selladas con parafilm para prevenir la fuga de gases, así como un tratamiento sin añadir aceites esenciales como testigo. Se consideró como insecto muerto a todos los que no mostraron movimientos ante la punción con aguja de disección entomológica. Los resultados de mortalidad se calcularon mediante la fórmula de Abbott (1925).

Índice de repelencia (IR) de *R. dominica*

Para evaluar la efectividad de los aleloquímicos vegetales volátiles (toxicidad, repelencia, concentraciones efectivas, tiempo de exposición u otros tipos de estímulos), se realizaron bioensayos con los tres tipos de aceites esenciales sobre *R. dominica*, utilizando un olfatómetro, adaptados a una técnica en común. Dos recipientes de plástico de 250 mL cada uno, se conectaron mediante un tubo de plástico de 15 x 1 cm de diámetro en los que se abrió una pequeña ventana de 1 x 1 cm equidistante a los dos recipientes. En uno de los recipientes se colocó 10 g de grano entero tratado con la fracción de aceite esencial y en el otro recipiente se colocó 10 g de grano entero sin tratar como control. Sobre esa dieta fueron aplicados los aceites con una concentración de 5, 10 y 15 $\mu\text{L}/\text{kg}$ con los respectivos testigos en blanco. Los envases se cerraron herméticamente quedando apoyados por una de sus caras para evitar movimientos y asegurar la estabilidad de la estructura. Luego de aplicado el aceite, se incorporaron 20 adultos de *R. dominica* edades estandarizadas (10 días) en el centro del tubo a través del hueco central, que posteriormente fue sellado con parafilm.

Se registró el número de insectos en cada recipiente luego de 24, 48 y 72 horas para determinar repelencia y mortalidad respectivamente. Mediante esta evaluación olfatométrica se pueden discriminar dos conductas: individuos que eligen la fuente aromática (atracción) y los que se alejan de ella (repelencia) dirigiéndose hacia los granos sin tratar. Para cada tratamiento se registró el número de insectos presentes en los envases, transformándolo en porcentaje de repelencia y/o mortalidad. Permitiendo calcular el índice de repelencia (IR) según lo descrito por Mazzonetto (2002), donde el tratamiento se clasifica como neutro si el índice es igual a 1, atrayente si es mayor a 1 y repelente si es menor a 1. El cálculo será por la siguiente fórmula:

$$\text{IR} = \frac{2G}{(G+P)}$$

Dónde: IR: Índice de repelencia

G: Porcentaje de insectos en el tratamiento

P: Porcentaje de insectos en el testigo

Emergencia de progenies (F1) de *R. dominica*

Para la estimar la emergencia se tomó una muestra representativa de 50 gramos con 20 ejemplares insectos de edades estandarizadas (10 días) para cada tratamiento con

los tres aceites esenciales, donde se aplicaron las dosis de 5, 10 y 15 µL/kg a intervalos de exposición de 24, 48 y 72 h. Una vez transcurrido el período de exposición los insectos adultos y los granos fueron colocados en un frasco de vidrio y dejados en una cámara climática con las condiciones de temperatura de 27 ± 2 °C y una humedad relativa del $70 \pm 5\%$, por un periodo de 45 a 50 días para obtener la progenie (F1) del insecto *R. dominica*.

Pérdida de peso del grano de trigo

El grano del ensayo anterior para cada tratamiento fue utilizado para determinar la pérdida de peso. Esta evaluación se realizó siguiendo la técnica propuesta por Adams y Schulten, 1976, en el que se compara el peso promedio del grano sano y daños de la muestra. Este método requiere el cálculo de la proporción en peso del grano dañado por el insecto y el porcentaje de grano no dañado y es calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{(SNd) - (DNs) * 100}{S (Nd + Ns)}$$

Donde S= peso de grano sano

D = peso de grano dañado

Ns = números de granos sanos

Nd = números de granos dañados

El porcentaje de grano dañado será calculado mediante la siguiente fórmula

Grano dañado (%) = Peso de granos dañados/peso original del grano x100

Análisis estadístico

El experimento se llevó a cabo en un arreglo factorial, donde el factor A son los aceites esenciales, factor B dosis (5, 10 y 15 µL/kg) y el factor C tiempos (24, 48 y 72 h) y cinco repeticiones por tratamiento y testigo.

Los datos obtenidos de la mortalidad, el índice de repelencia, la emergencia de insectos adultos y la pérdida de peso en el grano se sometieron a un análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Todos los datos se compararon con Tukey a un nivel de significancia de 0.05. El análisis estadístico se realizó utilizando un paquete computacional JMP versión 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mortalidad de *R. dominica*

La mortalidad en el tratamiento control fue cero, en el cual no existió una respuesta de muerte natural del insecto adulto en los periodos evaluados. Los tres tipos de aceite esencial mostraron una fuerte actividad contra *R. dominica*, obteniendo diferentes porcentajes de mortalidad entre los tratamientos y tiempos de exposición (Tabla 1). Además, su efectividad fue mayor al incrementar el tiempo de exposición y la dosis, existiendo una interacción entre los factores probados (Tabla 2). El aceite esencial de *M. viridiflora* fue el tratamiento que obtuvo una mayor efectividad sobre *R. dominica* alcanzando el 100% de mortalidad a las 24 h de exposición en todas las dosis probadas; el aceite de *E. ca-*

maldulensis presentó un efecto intermedio sobre el insecto y obteniendo una mortalidad completa en un periodo de 24 h para las dosis de 10 y 15 µL/kg; el aceite de *L. palmeri* fue el tratamiento con menor incidencia sobre la plaga obteniendo una mortalidad de 82% con una dosis de 15 µL/kg a las 72 h (Tabla 1 y 2). Sin embargo, la mortalidad obtenida en los tratamientos de *L. palmeri* a las dosis probadas de 5 y 10 µL/kg se encontraron por debajo del límite establecido del 50% de mortalidad para el uso de productos de origen botánico (Lagunes, 1994).

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad (Error estándar) de *R. dominica* expuestos con tres aceites esenciales a diferentes dosis y periodos de exposición.

Table 1. Percentage of mortality (Standard error) of *R. dominica* exposed with three essential oils at different doses and exposure times.

| *Dosis (µL/kg) | Aceite esencial | Tiempo (h) | | |
|----------------|-------------------------|-------------|------------|------------|
| | | 24 | 48 | 72 |
| 5 | <i>M. viridiflora</i> | 94 ± 1.73ab | 100a | - |
| | <i>E. camaldulensis</i> | 86 ± 1.73b | 100a | - |
| | <i>L. palmeri</i> | 14 ± 1.73d | 32 ± 1.41c | 36 ± 1.73c |
| 10 | <i>M. viridiflora</i> | 100a | - | - |
| | <i>E. camaldulensis</i> | 92 ± 1.41b | - | - |
| | <i>L. palmeri</i> | 32 ± 1.41d | 32 ± 1.73d | 46 ± 1.73c |
| 15 | <i>M. viridiflora</i> | 100a | - | - |
| | <i>E. camaldulensis</i> | 100a | - | - |
| | <i>L. palmeri</i> | 46 ± 1.73d | 64 ± 1.73c | 82 ± 1.41b |

Valores con diferente letra en cada dosis tratada son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, P < 0.05).

Tabla 2. Prueba factorial del porcentaje de mortalidad para *R. dominica* en diferentes aceites esenciales, dosis y periodos de exposición.

Table 2. Factorial test of mortality percentage of *R. dominica* at different essential oils, doses, and exposure times

| | Parámetros estadísticos | Dosis (µL/kg) | | |
|----------------------------|-------------------------|---------------|---------|---------|
| | | 5 | 10 | 15 |
| Tiempo | F | 53.91 | 27.28 | 131.63 |
| | P | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| | gl | 2 | 2 | 2 |
| Aceite esencial | F | 865.66 | 1301.65 | 789.75 |
| | P | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| | gl | 2 | 2 | 2 |
| Tiempo* Aceite esencial | F | 5.86 | 8.34 | 131.63 |
| | P | < 0.01 | < 0.001 | < 0.05 |
| | gl | 4 | 4 | 4 |

Los grados de libertad de las repeticiones por los factores y sus interacciones fueron 44.

El uso de los aceites esenciales como alternativas de control en el manejo de plagas depende de la dosis y del período de exposición. Se han demostrado que al incrementar la dosis de los aceites esenciales aumenta la eficiencia sobre los adultos de *R. dominica*, reportando mortalidades totales de este insecto a las 24 h de exposición utilizando dosis de hasta 129.03 µL/L_(aire) de los aceites esenciales de *Mentha pulegium* L. (Lamiales: Lamiaceae), *Lavanda stoechas* L. (Lamiales: lamiaceae) y *Ruta chalepensis* L. (Sapindales: Rutaceae) (Ncibi et al., 2020). Además, se han reportado que al incrementar el tiempo de exposición la efectividad de los aceites de *Eucalypt-*

tus globulus L. (Myrtales: Myrtaceae) y *L. stoechas* aumenta sobre el insecto *R. dominica* (Ebadollahi *et al.*, 2010; Chandel *et al.*, 2019). Estos resultados comparados con los datos obtenidos en el estudio nos permiten subrayar la presencia de insecticidas potenciales contra *R. dominica*.

Índice de Repelencia (IR) de *R. dominica*

Los tres aceites esenciales registraron una actividad repelente sobre los adultos de *R. dominica*, obteniendo un IR menor de 1 en cada dosis y tiempos de exposición probado, lo cual los clasifica como repelentes. (Figura 1).

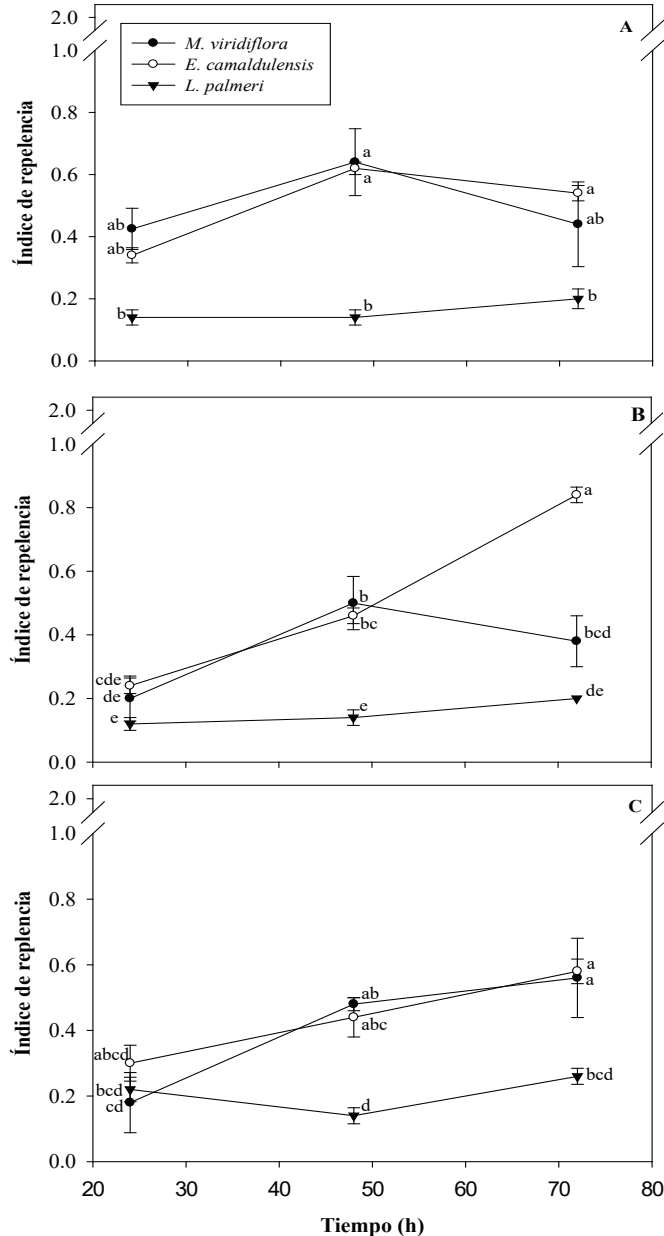


Figura 1. Índice de repelencia de *R. dominica* expuestos con tres aceites esenciales a diferentes dosis (A) 5 µL/kg, (B) 10 µL/kg y (C) 15 µL/kg. Valores con diferente letra son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $P < 0.05$).

Figure 2. Repellency index of *R. dominica* exposed with three essential oils at different doses (A) 5 µL/kg, (B) 10 µL/kg y (C) 15 µL/kg. Values with different letters are significantly different (Tukey's test, $P < 0.05$).

Tabla 3. Prueba factorial del índice de repelencia de *R. dominica* en diferentes aceites esenciales, dosis y periodos de exposición.

Table 3. Factorial test of *R. dominica* repellency index at different essential oils, doses, and exposure times.

| | Parámetros estadísticos | Dosis (µL/kg) | | |
|-----------------|-------------------------|---------------|---------|---------|
| | | 5 | 10 | 15 |
| Tiempo | F | 4.91 | 26.74 | 10.81 |
| | P | < 0.05 | < 0.001 | < 0.001 |
| | gl | 2 | 2 | 2 |
| Aceite esencial | F | 27.09 | 41.57 | 12.65 |
| | P | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| | gl | 2 | 2 | 2 |
| Tiempo* | F | 1.86 | 11.40 | 2.99 |
| | P | 0.139 | < 0.001 | < 0.05 |
| | gl | 4 | 4 | 4 |

Los grados de libertad de las repeticiones por los factores y sus interacciones fueron 44

Además, el IR fue significativamente diferente para cada aceite esencial y tiempo de exposición en las diferentes dosis probadas, mostrando una interacción entre estos factores para las dosis de 10 y 15 µL/kg (Tabla 3). El aceite de *L. palmeri* mostró una mayor actividad repelente sobre los adultos de *R. dominica* en todas las dosis probadas con respecto a los otros dos aceites esenciales (Figura 1). El aceite de *M. viridiflora* fue el que obtuvo un IR intermedio y el *E. camaldulensis* fue el aceite que menor actividad repelente presentó para cada dosis probada (Figura 1 A, B). Sin embargo, al incrementar la dosis a 15 µL/kg no mostró diferencias significativas con respecto al aceite de *M. viridiflora* (Figura 1 C).

El IR de los aceites esenciales en contra del insecto *R. dominica* depende de la especie de la planta donde se extrae el aceite esencial y el período de exposición, como es en el caso de *E. camaldulensis* que al incrementar el tiempo de exposición de 72 horas el IR disminuye, puede ser al que el insecto se va adaptando a los componentes volátiles del aceite esencial. Se ha observado este tipo de comportamientos en *R. dominica* con los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. camaldulensis* indicándose que los aceites esenciales ejercen un efecto activador del metabolismo de los insectos para sintetizar una mayor cantidad de enzimas amilolíticas, y así contrarrestar el efecto insecticida permitiendo al insecto, digerir el almidón del grano (Reyes-Guzmán *et al.*, 2012). (Figura 1B). También se ha reportado que la concentración del aceite esencial influye sobre la actividad repelente, estudios con *Eucalyptus globulus* en contra de *R. dominica* encontraron que cuando la dosis se incrementa a 0.16, 0.24 y 0.32 µL/cm² la actividad repelente tiende a aumentar a 43.5, 47.5 y 62.5% respectivamente, después de las 36 horas de exposición (Aref y Valizadegan, 2015). Otros estudios han registrado la repelencia sobre *R. dominica* con el uso de otros aceites esenciales a una dosis de 70 µL/L aire de las especies de *Eucalyptus kruseana*, *E. floribunda*, *E. dundasii* L. (Myrtales: Myrtaceae) con un índice de repelencia de 0.23, 0.39 y 0.39, respectivamente (Aref y Valizadegan, 2015). Estos valores se encuentran dentro de los rangos observados en nuestros resultados obteniendo un IR máximo de 0.84 y un mínimo

de 0.12 para *E. camaldulensis* y *L. palmeri*, respectivamente (Figura 1). En base a los resultados obtenidos los aceites esenciales de *L. palmeri*, *M. viridiflora* y *E. camaldulensis* pueden ser considerados candidatos como agentes repelentes de *R. dominica*.

Emergencia de la progenie (F1) *R. dominica*

La emergencia de adultos de *R. dominica* en el tratamiento control fue mayor en comparación con los demás tratamientos con los aceites esenciales obteniendo una media de 41.8 individuos ($P < 0.05$). Los tres aceites esenciales registraron emergencia de los individuos adultos de *R. dominica* (Figura 2).

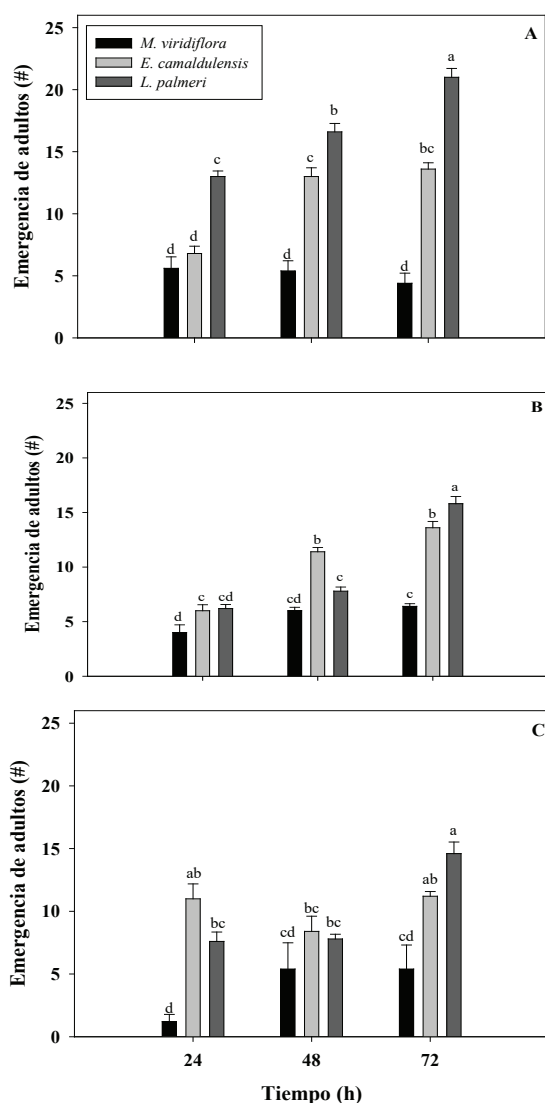


Figura 2. Emergencia de adultos de *R. dominica* expuestos con tres aceites esenciales a diferentes dosis (A) 5 µL/kg, (B) 10 µL/kg y (C) 15 µL/kg. Valores con diferente letra son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $P < 0.05$).

Figure 2. Emergency of *R. dominica* adults exposed with three essential oils at different doses (A) 5 µL/kg, (B) 10 µL/kg y (C) 15 µL/kg. Values with different letter are significantly different (Tukey's test, $P < 0.05$).

La emergencia de los adultos de *R. dominica* fue significativamente diferente para cada aceite esencial y tiempo de exposición probados, mostrando una interacción entre estos dos factores para cada dosis tratada (Tabla 4). El aceite de *M. viridiflora* presentó un mayor efecto sobre la emergencia de *R. dominica* con respecto a los otros dos aceites esenciales, donde solamente lograron emerger una media de 1.2 individuos en la dosis de 15 µL/kg a las 24 h de exposición (Figura 2 C). El aceite de *E. camaldulensis* fue el que mostró una emergencia intermedia en general del insecto en todas las dosis probadas (Figura 2). El aceite *L. palmeri* a una dosis de 5 µL/kg a un tiempo de exposición de 72 h fue el que obtuvo un menor efecto sobre la emergencia de *R. dominica* con una media de 21 adultos emergidos (Figura 1 A).

Tabla 4. Prueba factorial de la emergencia de adultos de *R. dominica* en diferentes aceites esenciales, dosis y periodos de exposición.

Table 4. Factorial test of the emergency of *R. dominica* adults at different essential oils, doses, and exposure times.

| Parámetros estadísticos | Dosis (µL/kg) | | | |
|-------------------------|---------------|---------|---------|---------|
| | 5 | 10 | 15 | |
| Tiempo | F | 209.33 | 91.87 | 25.94 |
| | P | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| | gl | 2 | 2 | 2 |
| Aceite esencial | F | 33.01 | 109.32 | 8.72 |
| | P | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| | gl | 2 | 2 | 2 |
| Tiempo* Aceite esencial | F | 14.55 | 22.24 | 4.07 |
| | P | < 0.001 | < 0.001 | < 0.01 |
| | gl | 4 | 4 | 4 |

Los grados de libertad de las repeticiones por los factores y sus interacciones fueron 44

Otros estudios han reportado una inhibición total de la progenie F1 de *R. dominica* en dosis de 10 y 15 µL/kg del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a un tiempo de exposición 72 h, pero con el aceite de *E. camaldulensis* se tiene una emergencia máxima de 29.3 individuos por un tiempo de exposición de 72 h y una mínima de 14 individuos a un periodo de 48 h, ambas con la dosis de 15 µL/kg (Reyes-Guzmán *et al.*, 2012). Estos resultados con el aceite *E. camaldulensis* son similares a los obtenidos en nuestro estudio, teniendo el mismo comportamiento que ha medida incrementa el período de exposición aumenta el número de adultos emergidos de *R. dominica*. Batish *et al.* (2008), reportó que impregnando al grano con el aceite esencial de *Eucalyptus* spp. se endurece la capa externa del huevo y previene su desarrollo por la falta de oxígeno. Sin embargo, en este estudio se obtuvo un efecto de estrés sobre el insecto adulto mediante la saturación de la atmosfera con los diferentes tipos aceite esencial utilizados y aumentando la dosis aplicada.

Pérdida de peso del grano de trigo

La pérdida de peso producido por *R. dominica* en el tratamiento control fue mayor en comparación con los tratamientos de los aceites esenciales obteniendo una media de 11% ($P < 0.05$), además los tres aceites esenciales influyeron

sobre la alimentación del insecto (Tabla 5). La pérdida de peso obtenido fue significativamente diferente para cada aceite esencial y el tiempo de exposición, así como su interacción para los tratamientos de 5 y 10 µL/kg, para la dosis de 15 µL/kg la interacción de los factores aceite esencial y tiempo de exposición no fue significativo (Tabla 4). El aceite de *M. viridiflora* fue el tratamiento que obtuvo una menor pérdida de peso registrando una mínima de un 0.22% con una dosis de 15 µL/kg a las 24 h de exposición, mientras que el aceite *E. camaldulensis* presentó una mayor pérdida de hasta un 4.61% con una dosis de 5 µL/kg a las 72 h de exposición (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de la pérdida peso del trigo (Error estándar) producido por *R. dominica* expuestos con tres aceites esenciales a diferentes dosis y periodos de exposición.

Table 5. Percentage of wheat loss weight (Standard error) produced by *R. dominica* exposed to three essential oils at different doses and exposure times.

| Dosis (µL/kg) | Aceite esencial | Tiempo (h) | | |
|---------------|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | | 24 | 48 | 72 |
| 5 | <i>M. viridiflora</i> | 1.87 ± 0.07c | 1.16 ± 0.11d | 1.24 ± 0.04d |
| | <i>E. camaldulensis</i> | 0.76 ± 0.04e | 4.33 ± 0.03b | 4.61 ± 0.06a |
| | <i>L. palmeri</i> | 0.72 ± 0.04e | 1.08 ± 0.05d | 1.27 ± 0.07d |
| 10 | <i>M. viridiflora</i> | 0.70 ± 0.06f | 1.32 ± 0.07d | 1.11 ± 0.04de |
| | <i>E. camaldulensis</i> | 1.73 ± 0.06c | 3.68 ± 0.06b | 4.17 ± 0.05a |
| | <i>L. palmeri</i> | 0.70 ± 0.05f | 1.04 ± 0.05e | 1.30 ± 0.08d |
| 15 | <i>M. viridiflora</i> | 0.22 ± 0.09d | 0.92 ± 0.47cd | 0.80 ± 0.35cd |
| | <i>E. camaldulensis</i> | 1.66 ± 0.08bc | 2.62 ± 0.12ab | 2.19 ± 0.08b |
| | <i>L. palmeri</i> | 2.30 ± 0.09b | 1.10 ± 0.08cd | 3.56 ± 0.10a |

Valores con diferente letra en cada dosis tratada son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, P < 0.05).

Tabla 6. Prueba factorial de la pérdida de peso del trigo por *R. dominica* en los diferentes aceites esenciales, dosis y periodos de exposición.

Table 6. Factorial test of wheat loss weight by *R. dominica* at different essential oils, doses, and exposure times.

| Parámetros estadísticos | | Dosis (µL/kg) | | |
|-------------------------|----|---------------|---------|---------|
| | | 5 | 10 | 15 |
| Tiempo | F | 46.01 | 132.52 | 8.49 |
| | P | < 0.001 | < 0.001 | < 0.01 |
| | gl | 2 | 2 | 2 |
| Aceite esencial | F | 80.73 | 312.23 | 23.18 |
| | P | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| | gl | 2 | 2 | 2 |
| Tiempo*Aceite esencial | F | 52.35 | 41.87 | 0.75 |
| | P | < 0.01 | < 0.001 | 0.475 |
| | gl | 4 | 4 | 4 |

Los grados de libertad de las repeticiones por los factores y sus interacciones fueron 44

La pérdida de peso para cada aceite esencial fue variando a medida que se trataban con diferentes dosis, en la dosis de 5 µL/kg los aceites que obtuvieron una menor pérdida de peso fueron *E. camaldulensis* y *L. palmeri*, para la dosis de 10 µL/kg fueron *M. viridiflora* y *L. palmeri*, y finalmente en la dosis de 15 µL/kg fue *M. viridiflora*. Estos datos fueron registrados a las 24 h de exposición, sugiriendo que al incrementar el periodo de exposición con los aceites esencia-

les el insecto suele adaptarse a ellos y aumenta su actividad metabólica. La actividad metabólica de *R. dominica* depende de sus enzimas digestivas que le permiten alimentarse de los granos y están conformadas por isoamilasas que hidrolizan el almidón y enzimas del tipo serina proteasas (Zhu-Salzman *et al.*, 2003; Cinco-Moroyoqui *et al.*, 2008; Osuna-Amarillas *et al.*, 2012).

Otros estudios han registrado alteraciones en la fisiología nutricional con *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) utilizando el aceite esencial de hojas y frutos de *Schinus molle* L. (Magnoliopsida: Anacardiaceae), además, el aceite de frutos produjo efecto inhibitorio de la alimentación con un índice fagodisuasivo de 62% (Benzi *et al.*, 2009). En nuestro estudio la pérdida de peso del trigo fue menor en los tratamientos con los aceites esenciales con respecto al control debido a que la emergencia de la nueva generación F1 fue relativamente baja. Además, se sugiere que los estados larvarios (etapa con mayor apetito del insecto) fueron afectados por estar expuestos a los aceites esenciales alterando su alimentación, ya que los componentes de los aceites esenciales por lo general son desfavorables para el insecto, produciendo una inhibición de su alimentación u ovoposición (Cruzat *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

El potencial de efectividad de los aceites esenciales para el control correctivo de la plaga *R. dominica* difiere de acuerdo con el tipo de aceite esencial quedando en el siguiente orden: *M. viridiflora*, *E. camaldulensis* y *L. palmeri*. La mortalidad de *R. dominica* incrementa con el aumento de las dosis y el periodo de exposición. Además, entre los aceites esenciales probados *M. viridiflora* fue el que ejerció un mayor efecto inhibitorio sobre la emergencia de *R. dominica* y a su vez obtuvo la mayor reducción en la pérdida de peso en el grano de trigo. También, los aceites esenciales seleccionados mostraron tener un control preventivo sobre el insecto, siendo *L. palmeri* el que mostró mayor actividad repelente con respecto a los otros dos aceites esenciales. Sin embargo, al incrementar el periodo de exposición con los aceites esenciales disminuía su actividad repelente. Estos aceites esenciales pueden ser utilizados como una alternativa natural para reducir la presencia de insectos durante el almacenamiento de trigo, constituye una herramienta de bajo impacto ambiental adaptada a las necesidades socio-económicas de pequeños y medianos productores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por el financiamiento otorgado para la realización del presente estudio a través del proyecto PROMEP/103.5/10/4593.

LITERATURA CITADA

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>

- Adams, J.M. y Schulten, G.G.M. 1976. Losses caused by insects, mites and microorganisms. In: American Association of Cereal Chemists. Postharvest grain loss assessment methods. Slough, England. P. 83-93.
- Aref, S.P. y Valizadegan, O., 2015. Fumigant toxicity and repellent effect of three Iranian Eucalyptus species against the lesser grain beetle, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Col.: Bostrichidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 3: 198-202.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1975. William Horwintz, Alam Sen Zel and Helen Reynolds. *Research in Veterinary Science*. 6.006. Ed. (25): 77.
- Batish, D. R., Pal-Singh, H., Kohli, R. K. y Kaur, S. 2008. *Eucalyptus* essential oil as natural pesticide. *Forest Ecology and Management*. 256: 2166-2174. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>
- Benzi, V., Stefanazzi, N. y Ferrero, A.A. 2009. Biological activity of essential oils leaves and fruits of pepper tree (*Schin molle* L.) to control rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*. 69 (2): 154-159.
- Bouvier, J., Buès, R., Boivin, T., Boudinhon, L., Beslay, D. y Sauphanor, B. 2001. Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity* 87: 456-462.
- Cinco-Moroyoqui, F.J., Díaz-Malvárez, F.I., Alanís-Villa, A., Barrón-Hoyos, J.M., Cárdenas-López, J.L., Cortez-Rocha, M.O. y Wong-Corral, F.J. 2008. Isolation and partial characterization of three isoamylases of *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: bostrichidae). *Comparative Biochemistry Physiology B*. 150: 153-160.
- Cruzat, M., Silva, G., Serri, H. y Hepp, R. 2009. Protección de Ocho Cultivares de Trigo con Polvo de *Peumus boldus* Molina Contra *Sitophilus zeamais* Motshulsky. *IDESIA (Chile)* 27 (2): 39-46.
- Chandel, R.K., Nebapure, S.M., Sharma, M., Subramanian, S., Srivastava, C. y Khurama, S.M.P. 2019. Insecticidal and repellent activities of eucalyptus oil against lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (Fabricius). *Journal Microbiology Biotechnology and Food Science* 9 (3): 525-529.
- Ebadollahi, A., Safaralizadeh, M.H. y Pourmirza, A.A. 2010. Fumigant toxicity of essential oils of *Eucalyptus globulus* Labill and *Lavandula stoecha* L., grown in Iran, against the two Coleopteran Insect Pest; *Lasioderma serricorne* F. and *Rhyzopertha dominica* F. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 20 (1):1-5.
- Ghabbari, M.; Guarino, S.; Caleca, V.; Saiano, F.; Sinacori, M.; Baser, N.; Mediouni, J.;Verde, G. 2018. Behavior-modifying and insecticidal effects of plant extracts on adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Journal of Pest Science*, 91 (1): 907-917. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0952-6>
- Iturralde-García, R.D., Wong-Corral, F.J., Castañé, C., Riudavets, J. 2020. Susceptibility of *Rhyzopertha dominica* to high CO₂ modified atmospheres in packaged chickpeas. *Journal of Stored Products Research*, 85, 101537. [10.1016/j.jspr.2019.101537](https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.101537)
- Martínez-Evaristo, X.C., Borboa-Flores, J., Wong-Corral, F.J., Cinco-Moroyoqui, F.J., Del-Toro-Sánchez, C.L., González-de León, A., Ortega-Nieblas, M.M., Cornejo-Ramirez, Y.I., Osuna-Amarillas, P.S. y Cabral-Torres, F.A. 2015. Insecticidal Efficacy and Repellency of Oregano (*Lippia palmeri*) Essential Oil for Control of *Sitophilus zeamais* and *Prostephanus truncatus* in Stored Maize. *Southwestern Entomology*. 40 (4): 713-720. <https://doi.org/10.3958/059.040.0410>
- Lagunes, A. 1994. Uso de extractos, polvos vegetales, y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y del frijol en la agricultura de subsistencia. Colegio de Postgraduados. USAID, CONACYT, BORUCONSA. Texcoco, México. 35 pp.
- Mazzonetto, F. 2002. Efeito de genótipos de feijoeiro e de pós de origem vegetal sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) e *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Col: Bruchidae). 2002. 134p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba. [10.11606/T.11.2002.tde-31072002-141929](https://doi.org/10.11606/T.11.2002.tde-31072002-141929)
- Ncibi, S., Attia, S., Diop, S.M.B., Ammar, M. y Hance, T. 2020. Bio-insecticidal activity of three essential oils against *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Bostrichidae). *African Entomology*. 28 (2): 339-348. <https://doi.org/10.4001/003.028.0339>
- Osuna-Amarillas, P.S., Cinco-Moroyoqui, F.J., Cárdenas-López, J.L., Ezquerro-Brauer, J.M., Sotelo-Mundo, R., Cortez-Rocha, M.O., Barrón-Hoyos, J.M., Rouzaud-Sández, O. y Borboa-Flores, J., 2012. Biochemical and kinetic characterization of the digestive trypsin-like activity of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: bostrichidae). *Journal Stored Products Research*. 51: 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.06.005>
- Rees, D.P., 1995. Coleoptera. In: Subramanyam, Bh, Hagstrum, D.W. (Eds.), *Integrated Management of Insects in Stored Products*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-41.
- Reyes-Guzmán, R., Borboa-Flores, J., Cinco-Moroyoqui, F.J., Rosas-Burgos, E.C., Osuna-Amarillas, P.S., Wong-Corral, F.J., Ortega-Nieblas, M.M. y León-Lara, J.D. 2012. Actividad insecticida de aceites esenciales de dos especies de *Eucalyptus* sobre *Rhyzopertha dominica* y su efecto en enzimas digestivas de progenies. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18 (3): 385-394. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.02.015>
- Yang, C., Chang, X., Zhang, M., Ni, X., Gong, G., Yue, G., Sun, X. y Chen, H. 2017. Active compounds of stem bark extract from *Schima superba* and their molluscicidal effects on *Pomacea canaliculata*. *Journal of Pest Science*, 91 (1): 437-445. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0848-x>
- Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman, R.A., Shade, R.E. y Ahn, J.E., 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12 (2): 135-145. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2003.00395.x>