



Biotecnia

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



e-revist@s

indexada en

IC Journal
Master List

reDalyC.org

SciELO

Miembro de

Crossref



THOMSON REUTERS

PERIÓDICA
ÍNDICE DE REVISTAS LATINOAMERICANAS EN CIENCIAS

latindex



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

<http://biotecnia.unison.mx>

BIOTECNIA, 2022, 24, Número 2 (mayo – agosto), 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 5-11	Influencia del color en compuestos fenólicos y propiedades bioactivas de la miel de Guerrero, México
Original	pp 12-19	Contenido de acetogeninas a partir de semillas del fruto de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.): Evaluación de diferentes condiciones de extracción
Original	pp 20-27	Comportamiento de los compuestos volátiles regulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016 durante la destilación de Mezcal artesana
Original	pp 28-35	Estudio Físicoquímico de Quitina y Quitosana obtenidas a partir del exoesqueleto de camarón café (<i>Farfantepenaeus californiensis</i>)
Original	pp 36-44	Análisis químico-proximal, fitoquímico y potencial bacteriostático de <i>Eichhornia crassipes</i>
Original	pp 45-52	Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de los subproductos exoesqueleto y cefalotórax del camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>): perfil de ácidos grasos del extracto activo hexánico del cefalotórax del camarón blanco
Original	pp 53-58	Uso de vinazas de mezcal para producir metano por co-digestión con estiércol de bovino
Original	pp 59-68	Actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de fracciones de hidrolizado de proteínas de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.)
Original	pp 69-76	Evaluación de una dieta antioxidante para tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> con inclusión de subproducto de mango y jamaica
Original	pp 77-83	Rentabilidad y rendimiento de tres genotipos de maíz en respuesta al biofertilizante y nitrógeno, en clima templado
Original	pp 84-93	Composición química, digestibilidad y rendimiento de <i>Brachiaria decumbens</i> a diferentes edades de rebrote
Original	pp 94-103	Extracción, caracterización y actividad antioxidante de lignina de lirio acuático (<i>Eichhornia crassipes</i>) y cáscara de nuez pecanera (<i>Carya illinoensis</i>)
Original	pp 104-111	Predicción de la producción y rendimiento de frijol, con modelos de redes neuronales artificiales y datos climáticos
Original	pp 112-119	Concentración y método de aplicación de selenio en plántulas de pimiento

- Original pp 120-126 Propagación asexual de *Bursera glabrifolia* (Sapindales: Burseraceae) bajo diversas condiciones agronómicas de crecimiento
- Original pp 127-134 Descripción de los principales atributos (origen, sexo, edad, condición corporal y peso de sacrificio) a la llegada al matadero y su impacto en las características de la canal del caballo Cuarto de Milla de descarte
- Original pp 135-141 Remoción de capas para mejorar la apariencia y calidad de la cebolla
- Original pp 142-148 Rendimiento y valor nutritivo de cereales y cártamo forrajero en la Comarca Lagunera
- Original pp 149-154 Efecto de rizobacterias solubilizadoras de calcio en caracteres agronómicos y minerales de *Tagetes erecta*
- Original pp 155-161 Efectos del manejo productivo de un sistema agroforestal en la diversidad de parasitoides asociados (Hymenoptera: *Braconidae*) en Yucatán, México

Color influence on phenolic compounds and bioactive properties of honey from Guerrero, Mexico

Influencia del color en compuestos fenólicos y propiedades bioactivas de la miel de Guerrero, México

Mendoza-Bacilio C¹, Epifanio-Gómez R¹, Yam-Puc A³, Avila-Caballero LP¹, Palemón-Alberto F², Torres-Guzmán F⁴ and Bello-Martínez J^{1*}

¹ Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Av. Lázaro Cárdenas S/N Col. La Haciendita CU Sur C.P. 39070. Chilpancingo, Guerrero, México.

² Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Autónoma de Guerrero, C. P. 40020 Iguala de la Independencia, Guerrero, México.

³ Instituto Tecnológico de Mérida. Avenida Tecnológico km. 4.5 s/n. CP. 97118. Mérida, Yucatán, México.

⁴ Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad de Ciencias Naturales. Rancho Xalaco, Petaquillas Guerrero, México.

ABSTRACT

Honey is mainly composed of glucose and fructose between 80 and 85 %, which come from the nectar collected by bees; therefore, it is considered a great caloric source. The present study aimed to evaluate the influence of color, on chemical composition and bioactive properties of polyfloral honey collected in different geographical regions of Guerrero state, Mexico. Honey samples from the 2018 harvest were analyzed to determine their total phenolic and flavonoids content, as well as their antioxidant and antimicrobial activity. The phenolic and flavonoids content varied considerably, and the highest values were obtained for dark amber honeys. Similarly, dark amber honeys showed higher antioxidant activity. The antibacterial activity was more effective against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria; also, results indicated that fungi were less susceptible than bacteria. A positive correlation between color and antioxidant capacity was found. Correlation existed also between color vs phenolics content, vs flavonoid content or between phenolic vs flavonoid. Principal component analysis (PCA) on bioactive results was a useful tool to characterize different types of honey based on the variables of each group in relation to the similarity between the samples.

Key words: Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Honey bee, PCA.

RESUMEN

La miel está compuesta principalmente por glucosa y fructosa entre un 80 y 85 %, que provienen del néctar recolectado por las abejas; por tanto, se considera una gran fuente calórica. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la influencia del color en la composición química y las propiedades bioactivas de la miel polifloral de varias regiones geográficas del estado de Guerrero, México. Las muestras de miel fueron cosechadas en 2018 y se analizaron para determinar su contenido total de fenoles y flavonoides, así como su actividad antioxidante y antimicrobiana. El contenido total de fenoles y flavonoides varió considerable-

mente y los valores más altos se obtuvieron para las mieles de color ámbar oscuro. De manera similar, las mieles de color ámbar oscuro mostraron una mayor actividad antioxidante. La actividad antibacteriana fue más eficaz contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas; Además, los resultados indicaron que los hongos eran menos susceptibles que las bacterias. Se encontró una correlación positiva entre el color y la actividad antioxidante. También existió correlación entre el color y el contenido fenólico, el contenido de flavonoides o entre fenoles y flavonoides. El análisis de componentes principales (PCA) sobre los resultados bioactivos fue una herramienta útil para caracterizar diferentes tipos de miel en función con la similitud entre las muestras.

Palabras clave: Actividad antioxidante, Actividad antimicrobiana, Miel de abeja, ACP.

INTRODUCTION

Mexico is the third largest exporter of honey. The state of Guerrero (GRO) is the sixth largest producer in Mexico, with an annual production of ~ 2,029 tons in 2019. According to the Census of Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, there are >4,000 beekeeper`s in this state. The Small Coast (SC) and Big Coast (BC) mesoregions are the most productive (~53 % of the state`s total) (SIAP, 2019). The chemical composition and organoleptic properties (color, aroma, and flavor) of honeybee depend firstly on flowers, climate, and geographical regions (Kadri *et al.*, 2017). Regarding composition, it has been demonstrated that some phytochemicals like phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) present in honey have antioxidant properties (da Silva *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2018). Also, certain enzymes (glucose oxidase and catalase), ascorbic acid, proteins and carotenoids have been associated with these properties (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010).

Other authors have also studied the correlations between color and antioxidant activity, the phenolic and flavonoid contents of honey to determine if there is a correlation with floral origin (Panseri *et al.*, 2013; García-Tenesaca

*Autor para correspondencia: Jorge Bello Martínez
 Correo electrónico: belloj@uagro.mx

Recibido: 1 de octubre del 2020

Aceptado: 19 de enero de 2022

et al., 2018). Studies have demonstrated the antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and antitumoral properties of honey (Cruz *et al.*, 2014; Giménez-Bastida *et al.*, 2015; Bueno-Costa *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2017; Stagos *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2020). Honey production in Mexico has a very long tradition, dating back to ancient times (Rodríguez *et al.*, 2012). However, data on these properties in Mexican honeys are limited on the composition and bioactive properties of honeys from different geographical regions in Guerrero, Mexico. It is currently very important to determine parameters in honey samples, especially due to the productive and economic relevance on the Mexican honey market. Therefore, the present study aimed to evaluate the color influence on bioactive properties of polyfloral honey collected in different geographical regions of Guerrero state, Mexico.

MATERIALS Y METHODS

Honey samples

A total of 20 polyfloral honey samples (*Apis mellifera*) were collected in autumn 2018 by beekeepers, at different geographical regions in the state of Guerrero (Mexico) (Figure 1). All samples were stored at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in amber glass vials until use. A sugar analog (SA) was used as control, and it was composed by sucrose (1.5 g), 7.5 g maltose (7.5 g), 40.5 g fructose (40.5 g), glucose (33.5 g) and 17 mL of distilled water.

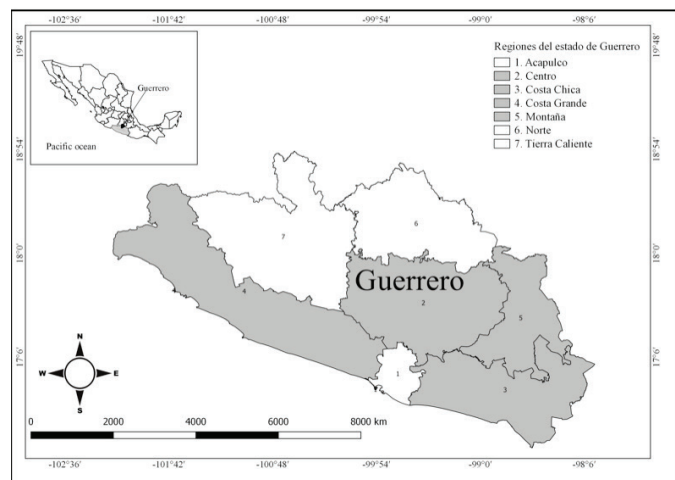


Figure 1. Mesoregions of the state of Guerrero, Mexico.
Figura 1. Regiones del Estado de Guerrero, México.

Color intensity

The color of honey samples was determined using a digital honey colorimeter (C221, Hanna® Instrument, CA, USA). The results were expressed in mm Pfund scale (0-150 mm) and named in accordance with the standard nomenclature (Ferreira *et al.*, 2009).

Total phenolic content

The total phenolic content (TPC) of honey samples was determined according to the Folin-Ciocalteu's phenol (FCP) method (Singleton *et al.*, 1999), with slight modifications. Briefly, 5 g of each sample was mixed with 50 mL of distilled

water to obtain a stock solution (10 % w/v). The resultant solution (0.5 mL) was mixed with 2.5 mL of FCP reagent (0.2 N) for 5 min, then 2 mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) (0.7 M) were added. The solution was incubated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h, in the dark. Absorbance was measured at 760 nm (VIS Genesys® 20, Thermo Scientific, NY, USA). TPC was determined using gallic acid as standard and expressed as mg of gallic acid equivalents/100 g of honey (mg GAE/100 g honey).

Total flavonoids content

The total flavonoids content (TFC) of honey samples was determined by the aluminum chloride (AlCl_3) complex formation method (Marghitas *et al.*, 2009), with slight modifications. Briefly, 1 mL of honey solution (1 mg/mL) was mixed with 0.3 mL of sodium nitrite (NaNO_2) (5 %), and 0.3 mL of AlCl_3 (10 %) was added, after five minutes. Subsequently, after six min, the reaction mixture was neutralized with 2 mL of sodium hydroxide (NaOH) (1 M). The absorbance was measured at 510 nm (VIS Genesys® 20, Thermo Scientific, NY, USA). TFC was determined using quercetin as standard and expressed as mg of quercetin equivalents/100 g of honey (mg QE/100 g honey).

Antioxidant activity assays

Free-radical scavenging activity. Antiradical activity was determined using the stable radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) method (Rodríguez *et al.*, 2012). Twenty μL of honey dissolved in methanol (10 %) was mixed with 200 μL of DPPH· solution (150 μM , in 80 % of methanol). The absorbance was measured at 517 nm after 30 min. Results were obtained using Trolox as standard and expressed as μmol of Trolox equivalents/100 g of honey ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g honey}$).

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. The TEAC assay was conducted following the modified methodology described by Vidal-Gutierrez *et al.* (2020). The radical solution was obtained by mixing 19.3 mg of ABTS in 5 mL of H_2O , with 88 mL of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ solution (140 mM) and incubated for 16 h in darkness. Subsequently, the radical absorbance was adjusted to an OD of 0.7 at 730 nm. Five μL of an aqueous honey solution (50 %) mixed with 245 μL of adjusted radical, were incubated for 5 min in the dark. The absorbance was measured at 730 nm. Results were reported as μM Trolox Equivalent ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g honey}$).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The FRAP assay was performed by the previous reported method (Tuberoso *et al.*, 2011). Briefly, the ferric complex was prepared by mixing 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 2,4,6-tri(2-pyridyl)striaizine (TPTZ) (40 mM, dissolved in 40 mM HCl) and 20 mM aqueous ferric chloride (FeCl_3) in a 10:1:1 proportion. Then, 20 ml of an aqueous honey solution (20 %) were mixed with 280 μL of ferric complex. The absorbance was measured at 630 nm in a microplate reader after 30 min of incubation in the dark. Results were expressed as $\mu\text{M Fe(II)}/100\text{ g honey}$.

Antimicrobial assay

Standard strains analyzed were *Escherichia coli* ATCC[®] 25922[™] (Gram-negative bacteria) and *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923[™] (Gram-positive bacteria), maintained in tryptone soy broth (TSB) at 4 °C, as well as *Candida albicans* ATCC[®] 90028[™] (fungal strain), maintained in Brain Heart Infusion broth (BHI) at 4 °C. The inoculums were prepared in TSB and BHI for bacteria and yeast respectively at 37 °C for 24 h. Cell suspensions were diluted in peptone water (0.1 %), to a 0.5 of McFarland scale concentration (1.5×10^6 CFU/mL). Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined with adapted method by Bueno-Costa *et al.* (2016). Briefly, 10 μ L of each 1.5×10^6 CFU/mL suspension, 90 μ L of Tryptone TSB or BHI and 100 μ L of each honey solution (12.5-400 mg/mL) were added to each pool. Negative control was distilled water, while the antibiotic ciprofloxacin (15 μ g/mL) and nystatin (100 IU/mL) were used as positive control. Plates with microdilution were incubated at 37 °C for 24 h and measured at 620 nm in a microplate reader (Thermo Scientific[™] Multiskan[™] FC, NY, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed through the IBM[®] SPSS[®] Statistics, 2020 software. A Principal Component Analysis (PCA), Pearson's correlation and linear regression analysis were carried out to evaluate the color influence on phenolic composition (TPC and TFC), antioxidant and antibacterial activity. The significance was set a $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Color intensity

Color of honey samples were high, ranging from 17.0 to 146.0 mm Pfund, with five colors found in the studied honeys (Table 1), White (20 %), Extra Light Amber (10 %), Light amber (25 %), Amber (25 %) and Dark amber (20 %) (Table 1). This is in agreement with Bueno-Costa *et al.* (2016), who reported Light Amber color for Brazilian honeys collected at different zones. Probably the dark tone found in Mexican honey is due to the wild origin of most honey produced in the country. In Guerrero state, Mexico, there is a wide variety of vegetation, which favors the dominance of wild honey, such as Tropical Deciduous Forest, Rain Forest and Coniferous Forest. Light honeys, such as the honey from the Harena Forest in Ethiopia, showed Pfund scales between 34 and 85 mm (Belay *et al.*, 2015).

Total polyphenol content

Table 2 show the results of TPC in honey samples. The total phenolic compounds were higher in Dark Amber honey (101.5 mg GAE/100 g honey), followed by Amber (66.4 mg GAE/100 g honey), Light Amber (68 mg GAE/100 g honey), Extra Light (42.5 mg GAE/100 g honey) and White (17.3 mg GAE/100 g honey). These results show a high correlation observed between color and TPC ($r = 0.895$, $p < 0.01$) (Table 4) this implies that the amount and type of polyphenolic substances in honey are variable and essentially depend on the floral origin (Küçük *et al.*, 2007). Similarly, the presence of

Table 1. Geographical origin and Color of the honey samples from the Guerrero State, Mexico.

Tabla 1. Origen geográfico y color de las muestras de miel del estado de Guerrero, México.

Samples	Region	Pfund scale ^a	Color
C1	Central	86	Amber
C2	Central	78	Light Amber
C3	Central	40	Extra Light Amber
C4	Central	146	Dark Amber
C5	Central	100	Amber
MT6	Mountain	17	White
MT7	Mountain	21	White
MT8	Mountain	18	White
MT9	Mountain	29	White
MT10	Mountain	35	Extra Light Amber
SC11	Small Coast	88	Amber
SC12	Small Coast	94	Amber
SC13	Small Coast	120	Dark Amber
SC14	Small Coast	129	Dark Amber
SC15	Small Coast	123	Dark Amber
BC16	Big Coast	89	Amber
BC17	Big Coast	72	Light Amber
BC18	Big Coast	82	Light Amber
BC19	Big Coast	64	Light Amber
BC20	Big Coast	68	Light Amber

a: In milimeters.

higher phenolic contents in darker color honeys than lighter honeys and their strong correlations are well documented for Cuban (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010), Argentina (Isla *et al.*, 2011), and Brazilian (Bueno-Costa *et al.*, 2016) honeys.

Total flavonoid content

The TFC of honeys samples are displayed in Table 2. The results showed that Dark Amber honey possess a high content of total flavonoids (22.45 mg CE/100 g honey), followed by Amber (16.24 mg QE/100 g honey), Light Amber (14.77 mg QE/100 g honey), Extra Light Amber (14.77 mg QE/100 g honey) and White (9.58 mg QE/100 g honey). These results also showed a high correlation between TPC and TFC ($r = 0.814$, $p < 0.01$) (Table 4). In addition, these results showed a high correlation between color values of the honey and TFC ($r = 0.864$, $p < 0.01$) (Table 4). TFC are also related to the floral sources as discussed previously Bueno-Costa *et al.* (2016).

Antioxidant activity

In this study, three *in vitro* assays were used to determine antioxidant activity. The DPPH[•] radical scavenging activity varied significantly among most honey samples (Table 2). The highest antioxidant activity (24.0 μ M TE/100 g honey) was observed in the Dark Amber honey sample (SC13), whereas the lowest activity (2.9 μ M TE/100 g honey)

Table 2. Chemical composition and antioxidant activity of the honey samples from the Guerrero State, Mexico.**Tabla 2.** Composición química y actividad antioxidante de las muestras de miel del Estado de Guerrero, México.

Samples	TPC	TFC	DPPH'	TEAC	FRAP
	(mg GAE/100 g honey)	(mg QE/100 g honey)	(μ M TE/100 g honey)	(μ M TE/100 g honey)	(μ M Fe(II)/100 g honey)
SA	2.0 ± 0.1	0.0 ± 0	0.0 ± 0	17.0 ± 0.5	27.0 ± 0.1
C1	60.0 ± 1	10.0 ± 0.6	8.2 ± 1	125.0 ± 15	361.0 ± 32
C2	58.0 ± 2	9.5 ± 0.8	8.4 ± 2	123.0 ± 29	345.0 ± 35
C3	50.0 ± 2	8.0 ± 0.2	7.8 ± 2	117.0 ± 11	332.0 ± 29
C4	101.0 ± 9	17.0 ± 0.1	19 ± 3	210.0 ± 34	405.4 ± 48
C5	59.0 ± 7	7.5 ± 0.3	7.9 ± 1	122.0 ± 18	367.0 ± 42
MT6	16.0 ± 8	4.0 ± 0.1	3.0 ± 2	40.0 ± 8	285.5 ± 31
MT7	19.0 ± 6	3.9 ± 0.1	2.9 ± 5	45.0 ± 5	275.6 ± 27
MT8	23.0 ± 9	3.5 ± 0.2	5.3 ± 1	86.0 ± 19	268.3 ± 17
MT9	80.0 ± 9	19.0 ± 0.9	9.1 ± 2	167.0 ± 32	295.4 ± 49
MT10	35.0 ± 4	7.1 ± 0.3	7.5 ± 1	127.0 ± 21	318.0 ± 35
SC11	65.0 ± 9	9.0 ± 0.9	10.1 ± 2	160.0 ± 29	390.0 ± 33
SC12	75.0 ± 9	9.5 ± 0.8	11.2 ± 1	189.0 ± 30	400.0 ± 17
SC13	119.0 ± 10	3.0 ± 0.1	24.0 ± 4	290.0 ± 28	465.7 ± 21
SC14	80.0 ± 9	18.0 ± 0.8	10.0 ± 1	174.0 ± 33	451.8 ± 11
SC15	106.0 ± 9	17.5 ± 0.7	21.0 ± 3	245.0 ± 25	432.1 ± 31
BC16	73.0 ± 6	7.5 ± 0.6	13.0 ± 1	185.0 ± 29	396.0 ± 26
BC17	54.0 ± 5	6.3 ± 0.5	8.7 ± 1	120.0 ± 17	370.0 ± 19
BC18	95.0 ± 4	5.8 ± 0.5	11.9 ± 3	200.0 ± 15	408.0 ± 11
BC19	63.0 ± 3	6.9 ± 0.1	8.3 ± 2	139.0 ± 29	299.0 ± 47
BC20	70.0 ± 2	7.0 ± 0.1	6.9 ± 1	148.0 ± 34	326.0 ± 39

* Values represent a mean \pm SD (n = 3) of three independent experiments. SA: sugar analog, C: Central, SC: Small Coast, BC: Big Coast and MT: Mountain.

were observed in White honey sample (MT7). Higher correlations were observed between the DPPH' activity and TPC ($r = 0.945$, $p < 0.01$), DPPH' activity and TFC ($r = 0.792$, $p < 0.01$), and between TPC and TFC ($r = 0.814$, $p < 0.01$). These results are similar with the reports of Ferreira *et al.* (2009), Alvarez-Suarez *et al.* (2010), Saxena *et al.* (2010) and Azonwade *et al.* (2018), who found that there is a positive correlation between DPPH', TPC, and TFC.

Free radical scavenged activity of honey samples was also determined through the TEAC assay (Table 2). Results evidenced that evaluated honey exhibited scavenging activity against ABTS⁺ radical, between 40.0 and 290 μ M TE/100 g honey, Dark Amber showing the highest TEAC values, with a correlation found between color and TEAC ($r = 0.824$) (Table 4). The results present here are similar with those of other authors who demonstrated a correlation between honey color and TEAC (Alvarez-Suarez *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017). Moreover, data obtained by the FRAP evaluation are presented (Table 2). The results obtained in Dark Amber exhibited a high ferric reducing activity (465.7 μ M Fe(II)/100 g honey). The antioxidant properties of the Dark Amber and Amber honeys were within the ranges of the antioxidant values reported for Polish honey (Kuś *et al.*, 2016). The differences in antioxidant properties of the honey samples could be due to the variations in phytochemicals of the respective plants and their

Table 3. Antimicrobial activity of honey samples from the Guerrero State, Mexico.**Tabla 3.** Actividad Antimicrobiana de mieles del estado de Guerrero, México.

Samples	Antimicrobial activity (mg/mL) ^a		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
SA	> 400	> 400	> 400
C1	75.0 ± 8.0	200.0 ± 22.0	75.0 ± 8.0
C2	75.0 ± 9.0	200.0 ± 14.0	50.0 ± 3.0
C3	50.0 ± 1.0	150.0 ± 5.0	75.0 ± 10.0
C4	12.5 ± 2.0	75.0 ± 4.0	25.0 ± 9.0
C5	75.0 ± 3.0	150.0 ± 11.0	300.0 ± 11.0
MT6	75.0 ± 5.0	150.0 ± 9.0	75.0 ± 9.0
MT7	75.0 ± 4.0	150.0 ± 1.0	75.0 ± 9.0
MT8	50.0 ± 2.0	100.0 ± 12.0	50.0 ± 8.0
MT9	12.5 ± 1.0	75.0 ± 10.0	50.0 ± 9.0
MT10	50.0 ± 3.0	150.0 ± 22.0	75.0 ± 11.0
SC11	75.0 ± 2.0	150.0 ± 20.0	75.0 ± 10.0
SC12	75.0 ± 1.0	150.0 ± 11.0	50.0 ± 9.0
SC13	12.5 ± 2.0	50.0 ± 7.0	50.0 ± 7.0
SC14	50.0 ± 3.0	75.0 ± 10.0	75.0 ± 8.0
SC15	12.5 ± 1.0	75.0 ± 8.0	75.0 ± 5.0
BC16	50.0 ± 2.0	150.0 ± 9.0	75.0 ± 9.0
BC17	75.0 ± 5.0	150.0 ± 10.0	250.0 ± 4.0
BC18	25.0 ± 5.0	75.0 ± 12.0	50.0 ± 3.0
BC19	25.0 ± 4.0	100.0 ± 11.0	75.0 ± 9.0
BC20	75.0 ± 5.0	200.0 ± 12.0	75.0 ± 8.0

* Values represent a mean \pm SD (n = 3) of three independent experiments. a: Antimicrobial activity by Minimum Inhibitory Concentration (MIC₅₀) necessary to inhibit 50 % of the microbial growth *in vitro*. SA: sugar analog.

geographical origins (Amarowicz *et al.*, 2004; Jasicka-Misiak, 2012). Higher correlations were observed between the FRAP and color ($r = 0.903$, $p < 0.01$), TPC ($r = 0.888$, $p < 0.01$) and TFC ($r = 0.830$, $p < 0.01$). The Dark Amber honeys exhibited higher antioxidant activity ($p < 0.01$) in all the antioxidant assays.

Antimicrobial activity

All honey samples showed antimicrobial activity against the two bacteria and yeast tested (Table 3). The antibacterial activity was more effective against Gram-positive than Gram-negative bacteria. Thus, more efficient results occurred against *S. aureus* with averagely range from 12.5 to 75.0 mg/mL. With regard to gram-negative bacteria, the MIC of the studied honeys samples varied from 50.0 to 200 mg/mL. Other authors reported that Gram-positive bacteria were more sensitive to the honeys antibacterial activities than Gram-negative ones (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010; Isla *et al.*, 2011). Regarding the antifungal activity against *C. albicans*, the study indicated that fungi were less susceptible than bacteria ranging from 50.3 to 300 mg/mL. The lower susceptibility of fungi to different honey samples, in comparison of bacteria, is documented (Kačániová *et al.*, 2011; Al-Waili *et al.*, 2013).

Table 4. Pearson's co-relation coefficient between evaluated parameters of honey samples from the Guerrero State, Mexico.**Tabla 4.** Coeficiente de correlación de Pearson entre parámetros evaluados de muestras de miel del Estado de Guerrero, México.

	Color	TPC	TFC	DPPH [•]	TEAC	FRAP	AASA	AAEC	AACA
Color	1.000								
TPC	0.895**	1.000							
TFC	0.864**	0.814**	1.000						
DPPH [•]	0.809**	0.913**	0.792**	1.000					
TEAC	0.824**	0.840**	0.800**	0.786**	1.000				
FRAP	0.903**	0.888**	0.830**	0.815**	0.834**	1.000			
AASA	-0.695	-0.608	-0.535	-0.522	-0.489	-0.653	1.000		
AAEC	-0.144	-0.053	-0.160	-0.023	-0.034	-0.226	0.265	1.000	
AACA	0.204	0.212	0.087	0.140	0.046	0.202	0.007	0.511*	1.000

Pearson's co-relation between color (Color), total phenol content (TPC), total flavonoids content (TFC), antioxidant activity with (DPPH[•]), antioxidant activity with (ABTS^{•+}), antioxidant activity with (FRAP), and antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus* (AASA), *Escherichia coli* (AAEC) and *Candida albicans* (AACA).

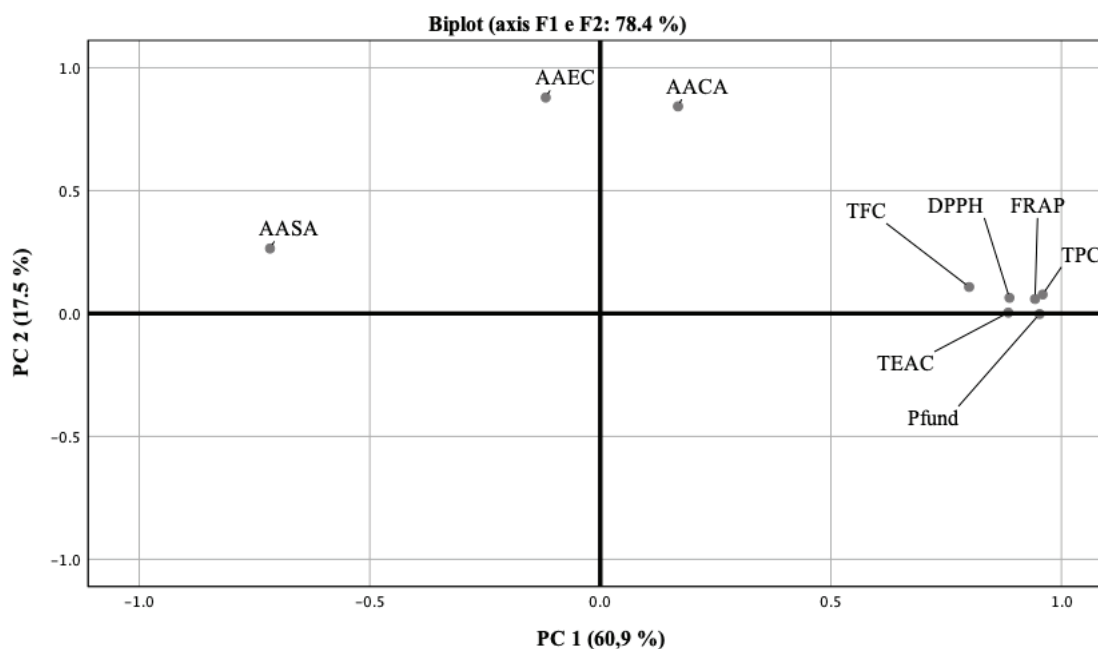
*Significant at $p < 0.05$, ** Significant at $p < 0.01$.

However, other factors, in addition to the phenolic composition, such as the presence of hydrogen peroxide, catalase and glucose oxidase, which are known to be present in honeys of diverse origins (Stagos *et al.*, 2018), may have contributed to the antimicrobial activity of the studied honeys. Moreover, the presence of a high content of flavonoids could contribute to its bioactivity. The same samples also showed the best results with regard to antioxidant activities, both of light amber color and showed intermediate compounds of phytochemicals. Moreover, the more antimicrobial properties of some of

the honeys could be due to their higher phenolic content and antioxidant properties. The strong relations of antimicrobial properties of honeys with their antioxidant properties and phenolic contents is well discussed (Isla *et al.*, 2011).

PCA analysis

Two major factors were extracted using PCA and the results are shown in Figure 2. These main components (PC1 and PC2) explained 60.9 and 17.5 % of the variability, respectively. The screen graph suggested that PC1 contained most

**Figure 2.** Principal component analysis plot of the evaluated parameters.**Figura 2.** Gráfico de componentes principales de los parámetros evaluados.

of the information, followed by PC2. The important variables in PC1 were Color, Total Phenol Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC) and Antioxidant Activity with, DPPH[•], TEAC and FRAP and finally PC2 was influenced by the antimicrobial activity against *S. aureus* (AASA), antimicrobial activity against *E. coli* (AAEC) and antimicrobial activity against *C. albicans* (AACA). A regression analysis was performed and Pearson's correlation coefficients were calculated to determine in detail the correlations between the variations in the biological properties of the samples. The graphs of the first two components clearly indicated that the darker honeys had higher content of phenol, flavonoids and antioxidant capacity than the lighter honeys, and that the antioxidant capacity was strictly related to the total phenolic content (Fig. 2). The multivariate linear analysis showed a high association between variables ($p \leq 0.01$). Color was correlated with total phenols ($r = 0.895$), total flavonoids ($r = 0.864$) and antioxidant capacity (DPPH[•] $r = 0.809$), (TEAC $r = 0.824$) and (FRAP $r = 0.903$). No statistically significant correlations were found between color and antimicrobial activity.

CONCLUSION

Dark amber honey shows the highest antioxidant activity values. Strong correlations were shown between phenolic content, antioxidant activity and color, showing that TPC, TFC and antioxidant activity are higher in dark honeys. On the other hand, the antimicrobial activity, especially with gram-positive microorganisms such as *S. aureus*, suggests that the analyzed honeys may play a relevant role as natural antibacterial products to reduce the effects of bacterial infections and contribute to better treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to all the beekeepers who have provided the honey samples of this study. This study was supported by a grant from the Secretary of Education in Mexico (SEP/PRODEP, 28942).

REFERENCES

- Aljadi, A.M. & Kamaruddin, M.Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*. 85: 513-518. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00596-4
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S. & Battino, M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2490-2499. doi: 10.1016/j.fct.2010.06.021
- Al-Waili, N., Al-Ghamdi, A., Ansari, M.J., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A. & Salom, K. 2013. Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research*. 44: 307-316. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.04.009
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. & Weil, J.A. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84: 551-56. doi:10.1016/S0308-8146(03)00278-4
- Azonwade, F.E., Paraiso, A., Dossa, C.P.A., Dougnon, V.T., N'tcha, C., Mousse, W. & Baba-Moussa, L. 2018. Physicochemical characteristics and microbiological quality of honey produced in Benin. *Journal of Food Quality*, Article ID 1896057, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2018/1896057>
- Belay, A., Solomon, W.K., Bultossa, G., Adgaba, N. & Melaku, S. 2015. Botanical origin, colour, granulation, and sensory properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*. 167: 213-219. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.080
- Baltrušaityte, V., Venskutonis, P.R. & Čeksteryte, V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*. 101: 502-514. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.007
- Bueno-Costa, R.M., Zambiasi, R.C., Wendt-Bohmer, B., Clasen-Chaves, F., Padilha da Silva, W., Teixeira-Zanusso, J. & Dutra, I. 2016. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Science and Technology*. 65(1): 333-340. doi: 10.1016/j.lwt.2015.08.018
- Cheng, N., Wang, Y. & Cao, W. 2017. The protective effect of whole honey and phenolic extract on oxidative DNA damage in mice lymphocytes using comet assay. *Plant Foods for Human Nutrition*. 72: 388-395. doi: 10.1007/s11130-017-0634-1
- Cruz, L.C., Batista, J.E.S., Zemolin, A.P.P., Nunes, M.E.M., Lippert, D.B., Royes, L.F.F., Soares, F.A., Pereira, A.B., Posser, T. & Franco, J.L. 2014. A study on the quality and identity of Brazilian pampa biome honey: Evidences for its beneficial effects against oxidative stress and hyperglycemia. *International Journal of Food Science*. Article ID 470214: 1-11. doi: 10.1155/2014/470214
- da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Fett, R. 2016. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*. 196: 309-323. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.051
- Deng, J., Liu, R., Lu, Q., Hao, P., Xu, A., Zhang, J. & Tan, J. 2018. Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to Manuka honey. *Food Chemistry*. 252: 243-249. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.115
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M. & Estevinho, L.M. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. 114: 1438-1443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.028>
- García-Tenesaca, M., Navarrete, E.S., Iturralde, G.A., Villacrés-Granda, I.M., Tejera, E., Beltrán-Ayala, P., Giampieri, F., Battino, M. & Alvarez-Suarez, J.M. 2018. Influence of botanical origin and chemical composition on the protective effect against oxidative damage and the capacity to reduce *in vitro* bacterial biofilms of monofloral honeys from the Andean region of Ecuador. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(1): 45. <https://doi.org/10.3390/ijms19010045>
- Giménez-Bastida, J.A. & Zieliński, H. 2015. Buckwheat as a functional food and its effects on health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63: 7896-7913. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02498

- Isla, M.I., Craig, A., Ordoñez, R., Zampini, C., Sayago, J., Badascar-Rasbure, E., Alvarez, A., Salomón, V. & Maldonado, L. 2011. Physico-chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. *LWT-Food Science and Technology*. 44: 1922-1930. doi:10.32604/phyton.2017.86.124
- Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Dereń, M. & Kafarski, P. 2012. Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry*. 131: 1149-1156. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.083
- Kadri, S.M., Zaluski, R. & de Oliveira, O.R. 2017. Nutritional and mineral contents of honey extracted by centrifugation and pressed processes. *Food Chemistry*. 218: 237-241. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.071
- Kaygusuz, H., Tezcan, F., Erim, F.B., Yildiz, O., Sahin, H., Cas, Z. & Kolayli, S. 2016. Characterization of Anatolian honeys based on minerals, bioactive components and principal component analysis. *LWT - Food Science and Technology*. 68: 273-279. doi:10.1016/j.lwt.2015.12.005
- Küçük, M., Kolayli, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltac, C. & Candan, F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*. 100: 526-534. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.010>
- Kus, P.M., Szwed, P., Jerkovic, I. & Tuberoso, C.I. 2016. Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. *Letters in Applied Microbiology*. 62: 269-276. doi: 10.1111/lam.12541
- Mărghitas, A.L., Dezmirean, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L. & Bogdanov, S. 2009. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*. 112: 863-867. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.055>
- Panseri, S., Manzo, A., Chiesa, L. M. & Giorgi, A. 2013. Melissopalynological and volatile compounds analysis of buckwheat honey from different geographical origins and their role in botanical determination. *Journal of Chemistry*. ArticleID904202:1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/904202>
- Pereira, J.R., da R. Campos A.N., de Oliveira, F.C., Silva V.R.O., David G.F., Da Silva J.G., Nascimento W.W.G., Silva Mauri.H.L. & Denadai A.M.L. 2020. Physical-chemical characterization of commercial honeys from Minas Gerais, Brazil, *Food Bioscience* 36(1): 100644. doi:10.1016/j.fbio.2020.100644
- Piljac-Zegarac, L., Stipcevic, T. & Belščak A. 2009. Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1(2): 43-50. doi:10.3896/IBRA.4.01.2.04
- Rodríguez, B.A., Mendoza, S., Iturriga, M.H. & Castaño-Tostado, E. 2012. Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. *Journal of Food Science*. 71: 121-127. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02487.x>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. 2019. Avance mensual de Producción Pecuaria año 2019 (Guerrero). http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceEdo.jsp
- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Stagos, D., Soultisiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis, C., Ntontos, A., Karkanta, F., Adamou-Androulaki, S., Petrotos, K., Spandidos, D.A., Kouretas, D. & Mossialos, D. 2018. Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *International Journal of Molecular Medicine*. 42(2): 726-734. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3656>
- Tuberoso, C.I.G., Bifulco, E., Caboni, P., Sarais, G., Cottiglia, F. & Floris, I. 2011. Lumichrome and phenyllactic acid as chemical markers of thistle (*Galactites tomentosa* Moench) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 364-369. doi: 10.1021/jf1039074
- Vidal-Gutiérrez, M., Robles-Zepeda, R.E., Vilegas, W., Gonzalez-Aguilar, G.A., Torres-Moreno, H. & López-Romero, J.C. 2020. Phenolic composition and antioxidant activity of *Bursera microphylla* A. Gray. *Industrial Crops and Products*. 152: 112412 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112412>
- Zhou, J., Li, P., Cheng, N., Gao, H., Wang, B., Wei, Y. & Cao, W. 2012. Protective effects of buckwheat honey on DNA damage induced by hydroxyl radicals. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 2766-2773. doi: 10.1016/j.fct.2012.05.046

Contenido de acetogeninas a partir de semillas del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.): Evaluación de diferentes condiciones de extracción

Acetogenin content from soursop fruit (*Annona muricata* L.) seeds: Evaluation of different extraction conditions

Aguilar-Hernández G^{1,2}, Zepeda-Vallejo LG³, García-Magaña ML¹, López-García UM¹, Aguilera-Aguirre S¹, Montalvo-González E^{1*}

¹ Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico 2595 Fracc. Lagos del Country, Tepic, Nayarit 63175, México.

² Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara. Ave. Rafael Casillas Aceves 1200, Guadalajara 47600, México.

³ Departamento de Química Orgánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Av. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas, Delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, 11340, México.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la extracción de acetogeninas (ACGs) de semillas de guanábana usando diferentes disolventes, métodos y número de extracciones. El trabajo se desarrolló en cuatro ensayos. En el primer ensayo se evaluaron siete disolventes (metanol, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, éter dietílico, hexano, y éter de petróleo) para extraer ACGs de semillas mediante extracción asistida con ultrasonido (EAU). En el segundo ensayo se comparó la EAU, método soxhlet y disolventes, para obtener ACGs de semillas desengrasadas. En el tercer ensayo se evaluó el efecto del disolvente y número de extracciones con EAU, sobre el contenido de ACGs en endospermo desengrasado. En el cuarto ensayo, se identificaron ACGs. Se observó una mayor presencia de ACGs en los extractos de semillas completas sin desengrasar, con metanol y acetato de etilo. La EAU extrajo más ACGs a partir de la semilla completa desengrasada. Sin embargo, usando el endospermo desengrasado, EAU y cinco extracciones con metanol por 50 min cada una, se obtuvo el mayor contenido de ACGs (25.14 mg/g base seca). Se identificaron dos ACGs (annonacina, y pseudoannonacina) en proporción 73:27. Estas últimas condiciones, son una alternativa para aumentar el rendimiento de extracción de ACGs de semillas de *A. muricata*.

Palabras claves: *Annona muricata*, acetogeninas, semillas, método soxhlet, extracción asistida con ultrasonido.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of soursop seeds acetogenins (ACGs) extraction methods, using different solvents, methods, and the number of extractions. The work was carried out in four trials. In the first trial, seven solvents (methanol, ethyl acetate, dichloromethane, chloroform, diethyl ether, hexane, and petroleum ether) were evaluated to extract ACGs from seeds by ultrasound-assisted extraction (EAU). In the second trial, EAU, soxhlet method, and solvents were compared to obtain ACGs from defatted seeds. In the third trial, the effect of solvents and the number of extractions by EAU on the content of ACGs in defatted endosperm was evaluated. In the fourth trial, ACGs were identified. The

highest presence of ACGs was observed in extracts obtained from defatted whole seeds with methanol and ethyl acetate. UAE extracted more ACGs from the defatted whole seed. However, the highest ACG content (25.14 mg/g dry basis) was obtained using the defatted endosperm, UAE, and five extractions with methanol for 50 min each. Two ACGs were identified (annonacin and pseudoannonacin) in proportion 73:27. The latter conditions are an alternative to increasing the extraction yield of ACGs from *A. muricata* seeds.

Keywords: *Annona muricata*, acetogenins, seeds, soxhlet method, ultrasound-assisted extraction.

INTRODUCCIÓN

Annona muricata (*A. muricata*) mejor conocida como guanábana es un fruto tropical altamente consumido en México por su exquisito sabor, aroma y valor nutrimental. Este fruto es muy apreciado por sus compuestos bioactivos (CB) y entre los más importantes están las acetogeninas (ACGs) (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020; León-Fernández *et al.*, 2016). Las ACGs son moléculas con cadena alifática de 35 a 37 átomos de carbono, unidas a uno, dos o tres anillos de tetrahydrofurano o tetrahidropirano en su región central; por lo que sean reportado más de 500 tipos de ACGs. La cadena alifática también presenta varios grupos oxigenados (OH) y una γ -lactona terminal α - β -insaturada o saturada, reordenada a veces para producir una cetolactona (Rupprecht *et al.*, 1990; Bermejo *et al.*, 2005). Las ACGs son compuestos considerados de alto interés farmacéutico debido a que a dosis muy bajas, pueden inhibir la actividad de la NADH ubiquinona oxidoreductasa del complejo I mitocondrial, y la NADH oxidasa de la membrana plasmática en células cancerosas, lo que reduce la producción de ATP de las células y por lo tanto su muerte (Bermejo *et al.*, 2005). Debido al mecanismo de acción de las ACGs, se ha demostrado su efecto anti-tumoral en una gran cantidad de modelos celulares cancerosos *in vitro* e *in vivo* (Coria-Tellez *et al.*, 2018; Neske *et al.*, 2020).

Por su importancia biológica, las ACGs se han aislado de diversas partes de las plantas de anonáceas, incluyendo el fruto de *A. muricata*; sin embargo, las semillas son las que presentan el mayor contenido de estos compuestos (Durán-

Ruiz *et al.*, 2019; Aguilar-Hernández *et al.*, 2020). Para obtener los extractos crudos y/o fracciones purificadas de ACGs de anonáceas, se han utilizado diferentes solventes: hexano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, metanol y etanol; esto debido a que la estructura química de las ACGs es variada y pueden tener baja polaridad baja (solubles en hexano), polaridad intermedia (solubles en cloroformo, diclorometano y acetato de etilo), y alta (solubles en metanol y etanol), pero son insolubles en agua (Bermejo *et al.*, 2005; Ranisaharivony *et al.*, 2015; León-Fernández *et al.*, 2017; Aguilar-Hernández *et al.*, 2020).

En adición, las tecnologías de extracción de ACGs mayormente reportadas son: fluidos supercríticos (FSC), maceración y método Soxhlet. Con el uso de FSC utilizando como fluido CO₂ y como co-solvente etanol, se obtuvieron concentraciones de 0.10-0.37 mg/g de ACGs a partir de semillas de *A. muricata*, identificando ocho ACGs (12,15-cis-squamostatina-A, squamostatina-A, bullatacina, squamostatina-D, squamocina, isodesacetilivaricina, asiminecina y desacetylavaricina) (Yang *et al.*, 2009). Por otro lado, con el uso de maceración con cloroformo por 7 días, se obtuvo solo el 0.13% de rendimiento de ACGs totales de semilla de *A. muricata* (Aguilar-Hernández *et al.* (2020)); mientras que por el método Soxhlet con metanol por 13 h, Ranisaharivony *et al.* (2015) reportan 0.067% de ACGs purificadas (annonacina, murisolina, annonacinona) a partir de la misma materia prima. Por los rendimientos de extracción de ACGs tan bajos hasta ahora reportados, se siguen estudiando nuevas tecnologías de extracción, y una alternativa es la extracción asistida con ultrasonido (EAU).

La EAU es considerada, una tecnología "verde" o emergente debido a que es fácil de escalar, bajo costo, uso de menor cantidad de solventes, tiempos de extracción corto y con mayores rendimientos (Chemat *et al.*, 2017; Aguilar-Hernández *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). El mecanismo de extracción consiste en la generación de numerosas microburbujas por efecto de la cavitación; éstas crecen exponencialmente y finalmente colapsan violentamente liberando una alta energía en el medio. Esta energía causa la ruptura de células, lo que a su vez, incrementa el área de superficie de contacto entre el compuesto a extraer y el solvente, facilitando su extracción (Chemat *et al.*, 2017). Hoy en día, existen una gran cantidad de estudios usando la EAU para extraer diversos compuestos bioactivos de diferentes plantas (Mohammadpour *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020); sin embargo, esta tecnología ha sido muy poco explorada para extraer ACGs de anonáceas.

En nuestro grupo de investigación se ha utilizado la EAU para extraer ACGs de *A. muricata*. En un primer estudio, León-Fernández *et al.* (2016), reportó que el uso de baño ultrasónico (42 kHz, 3 h) aumentó la extracción de ACGs en la pulpa de guanábana, aunque solo reportan el resultado de manera cualitativa. Aguilar-Hernández *et al.* (2020), optimizaron condiciones de EAU (tiempo de extracción 15 min, pulsos-ciclos 0.7 s, amplitud 100%) usando un equipo con sonda ultrasónica de manera directa, para obtener ACGs de semilla completa de guanábana. Estos autores utilizaron como

disolvente, cloroformo y obtuvieron una mayor concentración (13.01 mg/g) de ACGs comparada con los siete días de extracción por maceración (1.31 mg/g). Sin embargo, a pesar de haberse reportado las primeras condiciones optimizadas de EAU de ACGs en semillas y subproductos de frutos de *A. muricata*, no se evaluaron otros factores que intervienen en la eficacia de la extracción, tales como: preparación de materia prima, diferentes disolventes de extracción, mayor tiempo de extracción y número de veces que se requiere hacer la extracción en la misma matriz. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes disolventes, dos métodos de extracción (EAU y método soxhlet) y aumentar el número y aumentar el número de extracciones para obtener acetogeninas a partir de semillas del fruto de guanábana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Los frutos de *A. muricata* fueron recolectados en un huerto localizado en el municipio de Compostela, Nayarit, México, y se almacenaron hasta que alcanzaron la madurez de consumo (15-19 °Brix). Se despulparon los frutos para obtener las semillas, las cuales se secaron en horno (Memmert LL-50, Schwabach, Alemania) durante 24 h a 50 °C. El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en cuatro ensayos, que se describen a continuación.

Efecto de diferentes disolventes en la extracción de ACGs, a partir de semillas completas usando la EAU

Se usaron semillas completas secas y se pulverizaron en un molino multifuncional de alta velocidad (CGoldenWall HC-2000, San Francisco, CA, USA) hasta un tamaño de partícula de 80-300 µm. Se evaluaron siete disolventes (éter de petróleo, hexano, éter dietílico, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo y metanol) para extraer las ACGs. Las condiciones de EAU fueron: 15 min de extracción, pulsos-ciclos de 0.75 s y amplitud del 100 % (Aguilar *et al.*, 2020). Se empleó un sistema ultrasónico UP400S (400 W, frecuencia de 24 kHz) (Hielscher Ultrasonic, Teltow, Alemania). La sonda ultrasónica (H7 Tip 7, Hielscher, Teltow, Alemania), con máxima amplitud del 100 % (175 µm) y densidad de potencia acústica de 300 W/cm², se sumergió a 2 cm de la solución del extracto. Se colocaron 2 g de semillas completas molidas, en tubos de extracción con 15 mL de cada disolvente y se extrajeron bajo las condiciones antes mencionadas. Después, las muestras fueron centrifugadas (Hermle Z32HK, Wehingen, Alemania) a 9408 xg durante 5 min a 4 °C y los sobrenadantes se recuperaron para su análisis (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020).

Efecto del método y disolventes en la extracción de ACGs, a partir de semillas completas y desengrasadas

El polvo obtenido a partir de semillas completas se desengrasó utilizando el método de Soxhlet. La extracción de grasa se realizó con un equipo Soxhlet (Novatech VH-6, Jalisco, México) usando 10 g de muestra que se colocaron en el cartucho de extracción. Se añadieron 150 mL de hexano en el matraz Soxhlet y se realizó la extracción por 10 h (AOAC,

2005). Una vez que las muestras se desengrasaron, se secaron en el horno (Memmert LL-50, Schwabach, Alemania) durante 4 h a 50 °C.

Extracción de ACGs por los métodos de Soxhlet y ultrasonido

Para la extracción con el método soxhlet, se pesaron 10 g de muestra desengrasada seca y se colocaron en cartuchos de extracción. Se añadió al matraz 150 mL de cada disolvente de extracción, acetato de etilo y metanol, las cuales fueron seleccionados de acuerdo a los resultados cualitativos obtenidos en el primer ensayo. Después las muestras se colocaron en el equipo soxhlet durante 10 h (Durán-Ruiz *et al.*, 2019).

Para la EAU se tomaron los mismos gramos de muestra, se colocaron en un tubo de extracción y se añadió de manera directa 75 mL de cada uno de los disolventes seleccionados (acetato de etilo y metanol) y fueron ultrasonificados en el equipo de ultrasonido UP400S (400 W, frecuencia de 24 kHz) (Hielscher Ultrasonic, Teltow, Alemania) con las siguientes condiciones: pulsos-ciclos 0.75 s, amplitud 100 % y se aumentó el tiempo de extracción por 2 h. Los extractos obtenidos por los dos métodos de extracción fueron centrifugados (Hermle Z32HK, Wehingen, Alemania) a 9408 xg durante 5 min a 4 °C y los sobrenadantes se usaron para su análisis.

Efecto de disolventes y número de extracciones usando la EAU, en el contenido de ACGs del endospermo desengrasado

Se utilizaron semillas secas, se eliminó el tegumento manualmente, luego los endospermos fueron pulverizados. Posteriormente, se llevó a cabo el desengrasado de la muestra con el método Soxhlet como se mencionó anteriormente (AOAC, 2005), con modificaciones: se aumentó el tiempo de extracción de grasa por 24 h y se cambió el disolvente de extracción cada 8 h. Una vez que las muestras se desengrasaron, se secaron en el horno (Memmert LL-50, Schwabach, Alemania) durante 4 h a 50 °C. Después, se realizó la extracción de ACGs con EAU. Se inició el proceso colocando 5 g de muestra con 37.5 mL de cada disolvente (acetato de etilo y metanol, seleccionados desde el primer ensayo) en tubos de extracción y se extrajo por periodos de 50 min (5 veces) con pulsos-ciclos de 0.75 s y amplitud del 100 %. Los extractos obtenidos en cada tiempo fueron centrifugados (Hermle Z32HK, Wehingen, Alemania) a 9408 xg durante 5 min a 4 °C y los sobrenadantes se usaron para su análisis. Durante cada periodo de extracción, se llevó a cabo la medición de ACGs.

Análisis de la presencia y cuantificación de ACGs

Para los dos primeros ensayos, solo se evaluó la presencia de ACGs de manera cualitativa o visual; no se pudo realizar la cuantificación de estos compuestos por interferencias con lípidos presentes. Se hicieron reaccionar 250 µL de cada extracto y fueron mezclados con 2 mL del reactivo de Kedde (Aguilar *et al.*, 2020). En la reacción química, la gama lactona de las ACGs, reaccionan con el reactivo de Kedde (ácido 3,5- hidroxibenzoico disuelto en metanol y solución de

hidróxido de potasio al 5.7 %) formando un anión intermedio en medio alcalino, que se añade nucleofílicamente al ácido 3'5-dinitrobenzoico. Esto da como resultado un enlace C-C que produce un anión estable con una coloración de rosada que puede llegar hasta ser violeta si hay una alta concentración de ACGs (Cavé *et al.*, 1997). Los resultados se presentan como presencia o no de ACGs, considerando también de manera cualitativa, la intensidad de la coloración.

Para el tercer ensayo, fue posible realizar la cuantificación de ACGs. Se siguió el mismo procedimiento de reacción entre los extractos y reactivo de Kedde, y se midió la absorbancia a 505 nm en el espectrofotómetro (Jenway 6705, Dunmow, Reino Unido) en la mezcla de reacción. Se realizó una curva estándar de annonacina ($R^2=0.9745$) y los resultados se expresaron como contenido de acetogeninas totales (CAT) en miligramos equivalentes de annonacina por gramo de muestra seca (mg/g bs).

Cuantificación por HPLC e identificación por resonancia magnética nuclear (RMN) de ACGs aisladas del endospermo desengrasado

En este último ensayo, se extrajeron de nuevo las ACGs con EAU a partir del endospermo desengrasado y utilizando metanol como disolvente, el cual fue seleccionado en el tercer ensayo, por extraer el mayor contenido de ACGs. El extracto acetogénico crudo, se concentró a sequedad en un rotavapor (Yamato RE300, Tokio, Japón). El extracto seco (2 g) se sometió a una columna cromatográfica (6 cm x 25 cm). Como fase estacionaria se usó sílica gel (0.063-2 µm) y como eluyente inicial se utilizó una mezcla de diclorometano:acetato de etilo (2:1 v/v) con un aumento gradual de polaridad hasta finalizar con 100 % de etanol. Las fracciones se sometieron a cromatografía en capa fina (CCF) y reveladas con el reactivo de Kedde y Cerio/Molibdeno para confirmar la presencia o ausencia de ACGs (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020). De acuerdo a los resultados obtenidos en la CCF, se seleccionaron dos fracciones ricas en ACGs (F1 y F7).

Cuantificación de ACGs por HPLC

Las dos fracciones ricas en ACGs fueron resuspendidas en acetonitrilo grado HPLC, se inyectaron (20 µL) en un sistema de HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de arreglo de diodos y una columna de fase reversa C18 (tamaño de partícula de 5 µm, 4.6 mm de diámetro y 250 mm de largo; Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Como fases móviles se utilizó un gradiente constituido por acetonitrilo (eluyente A) y agua (eluyente B). Los estándares y las muestras se analizaron inicialmente con: 60 % A, 0-30 min; 70 % A; 35-40 min, 60 % A; 41-60 min, a un flujo de 0.8 mL/min. Las áreas de los picos en las fracciones analizadas se detectaron a 210 nm y para cuantificar las ACGs se utilizaron curvas de calibración de dos acetogeninas.

Identificación por RMN de ACGs

La fracción F7 fue seleccionada para separar ACGs individuales por medio del HPLC semi-preparativo (Agilent

Technologies 1260 Infinity, Waldbronn, Alemania). Se usó una columna semipreparativa en fase reversa C18, con tamaño de partícula de 8 μm , diámetro de 21.4 mm y longitud de 250 mm (Varian Dynamax). Como fases móviles se utilizaron acetonitrilo (eluyente A) y agua (eluyente B) con un gradiente al 60 % A, 0-30 min; 70 % A; 35-40 min, 60 % A; 41-80 min, flujo de 1.2 mL/min y longitud de onda de 210 nm. Se colectaron aproximadamente 50 mL del pico que presentó mayor área en tubos de vidrio y fueron concentrados hasta sequedad con aire. Las ACGs presentes en el pico colectado, fueron analizadas por resonancia magnética nuclear (RMN).

Para la identificación estructural de las ACGs se usó un equipo de RMN de 500 MHz (Varian VNMR System, Walnut Creek, CA, USA). El procedimiento consistió en colocar de 1-10 mg de muestra disuelta en 0.5 mL de cloroformo deuterado en tubos para RMN. Se obtuvieron espectros en 1D en la frecuencia de ^1H , ^{13}C , y mediante técnicas 2D de correlación homo (COSY) y heteronucleares (HSQC). Los desplazamientos químicos (ppm o δ) fueron asignados con respecto a la señal de referencia del tetrametilsilano (TMS).

Análisis de datos.

El análisis estadístico se aplicó para los datos obtenidos en el tercer ensayo y cuarto ensayo. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía por separado, para evaluar el efecto del número de veces de extracción (5 niveles), el efecto del tipo solvente (2 niveles) y el número de fracción de ACGs aisladas (2 niveles). Además se realizaron prueba de medias usando t-Student para comparación de dos tratamientos y prueba de medias de Tukey para comparar más de dos tratamientos, a un nivel de confianza del 95 %. Se usó el programa STATISTICA (v.8 StatSoft, Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes disolventes en la extracción de ACGs, a partir de semillas completas usando la EAU

En la Tabla 1, se observan los resultados de la presencia cualitativa de ACGs en todos los extractos obtenidos. Al realizar la reacción de las ACGs con el reactivo de Kedde, la mezcla de reacción se tornó de color rosado, característico de la presencia de ACGs; sin embargo la solución no fue transparente, si no turbia o blancuzca tipo emulsión. Por lo anterior, no se pudo cuantificar el CAT; sin embargo, visualmente se observó que en los extractos de acetato de etilo y metanol, el color rosado fue más intenso, por lo que se pudo inferir que en estos extractos había mayor presencia de ACGs. Los lípidos extraídos de las semillas (sin desengrasar) se solubilizaron en los solventes apolares (éter de petróleo, hexano, éter dietílico, cloroformo, diclorometano y acetato de etilo). Aunque el metanol es mayormente polar y no solubiliza los lípidos, la ruptura de las células generada por la alta energía del ultrasonido ocasionó que los lípidos estuvieran presentes en el extracto metanólico (Ketenoglu, 2020). La presencia de lípidos en los extractos, interfirió en la reacción para la cuantificación espectrofotométrica de las ACGs; debido a que en la reacción se agrega KOH para mantener un medio alcalino,

Tabla 1. Presencia cualitativa de acetogeninas en los extractos obtenidos con cada disolvente de extracción (metanol, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo), usando la extracción asistida con ultrasonido, a partir de semillas completas de *A. muricata*.
Table 1. Qualitative presence of acetogenins in extracts obtained with each extraction solvent (methanol, ethyl acetate, dichloromethane, chloroform, diethyl ether, hexane and petroleum ether), using ultrasound-assisted extraction from whole seeds of *A. muricata*.

Tratamiento	Disolvente	Presencia cualitativa de acetogeninas
1	Metanol	+++
2	Acetato de Etilo	+++
3	Diclorometano	+
4	Cloroformo	++
5	Éter dietílico	+
6	Hexano	+
7	Éter de petróleo	+

El mayor número del símbolo "+" indica un color rosado visualmente más intenso en la mezcla de reacción; lo cual infiere que hubo un mayor contenido de ACGs en el extracto.

lo que condujo a la saponificación de los lípidos, presentes en los extractos con dicha base (Proaño *et al.*, 2015).

Por otro lado, la mayor presencia de ACGs en los extractos con acetato de etilo y metanol se atribuye a que las ACGs tienen grupos funcionales polares, como grupos hidroxilos (-OH) y un grupo lactónico; así como grupos funcionales apolares, como anillos de tetrahidrofurano y cadena de carbonos; por lo tanto, los compuestos acetogénicos son solubilizados por solventes con polaridad de intermedia a alta, sin ser solubles en agua (Rupprecht *et al.*, 1990; Bermejo *et al.*, 2005). Es conocido que una sustancia es soluble en un disolvente cuando las fuerzas intermoleculares que unen a las moléculas de cada sustancia son menores o similares a las fuerzas de interacción con el disolvente, de tal manera que estas últimas pueden superar las fuerzas intermoleculares del soluto, solubilizándolo o disociándolo (Hassan *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2020).

Los resultados cualitativos de ACGs, fueron de mucha utilidad ya que a partir de ellos se seleccionaron como disolventes de extracción de ACGs, el acetato de etilo y metanol; además de desengrasar la materia prima.

Efecto del método y disolventes en la extracción de ACGs, a partir de semillas completas y desengrasadas

En el desengrasado de la semilla molida entera se obtuvo 27 % de grasa. Sin embargo, de nueva cuenta se pudo observar, que aun cuando se hizo un desengrasado de la muestra por 10 h, al hacer la reacción de los extractos con el reactivo de Kedde, se siguió presentando turbidez en la mezcla de reacción, siendo mayor en los extractos con acetato de etilo. Esto indicó que el tiempo de desengrasado, no fue suficiente para extraer todos los lípidos de las semillas. Así, tanto el método soxhlet como la EAU extrajeron los lípidos restantes de la materia prima, probablemente con mayor contenido de lípidos en el extracto de acetato de etilo por

tener menor polaridad que el metanol y solubilizar más fácilmente estos compuestos. Además, se observó que el dejar el tegumento en la semilla, el cual tiene un color café oscuro, provocaba cambios de color importante en los extractos, con cualquiera de los dos métodos de extracción.

En este estudio también se obtuvieron resultados positivos de la presencia cualitativa de las ACGs. Cuando se utilizó la EAU para extraer las ACGs, usando cualquiera de los dos solventes, se observó una mayor presencia de ACGs en comparación con el método Soxhlet (Tabla 2). Además, el tiempo de extracción con EAU fue 5 veces menor que usando el método soxhlet. La disminución en el tiempo de extracción y mayor presencia de ACGs por la EAU, se atribuye al fenómeno de cavitación. Este fenómeno provoca el agrandamiento de los poros de la pared celular, reduce el tamaño de las partículas del material vegetal por desintegración ultrasónica, que a su vez aumenta el número de células expuestas directamente al disolvente, causando una mayor extracción (Al-Dhabi *et al.*, 2016). Así mismo, la extracción de compuestos bioactivos mediante sonicación provoca la aceleración de las partículas, que a su vez inducen al soluto a pasar rápidamente al disolvente aumentando su difusividad en el tejido vegetal. Es necesario que el compuesto de interés sea altamente soluble en el disolvente para aumentar la eficiencia de extracción (Chemat *et al.*, 2017).

Tabla 2. Presencia cualitativa de acetogeninas en los extractos obtenidos con dos métodos de extracción (Soxhlet y EAU) y dos solventes (metanol y acetato de etilo), a partir de semillas completas desengrasadas (10 h) de *A. muricata*.

Table 2. Qualitative presence of acetogenins in *A. muricata* defatted (10 h) whole seeds extracts, obtained with two methods (Soxhlet and UAE) and two solvents (methanol and ethyl acetate).

Método de extracción	Disolvente	Presencia cualitativa de acetogeninas
Soxhlet	Metanol	+
Soxhlet	Acetato de etilo	+
EAU	Metanol	++
EAU	Acetato de etilo	++

EAU = Extracción asistida por ultrasonido. El mayor número del símbolo "+" indica un color rosado visualmente más intenso en mezcla de reacción; lo cual indica que existe un mayor contenido de ACGs en el extracto.

No fue posible evaluar de manera cualitativa el efecto del disolvente en la extracción de ACGs, ya que la intensidad en la coloración rosada por la presencia de ACGs, visualmente era similar tanto en el extracto metanólico como en el extracto con acetato de etilo. Así, se decidió realizar el tercer ensayo experimental, conservando los mismos solventes de extracción, se eliminó el tegumento de las semillas, se desengrasó el endospermo por más tiempo y se usó EAU como método de extracción.

Efecto de disolventes y número de extracciones usando la EAU, en el contenido de ACGs del endospermo desengrasado

En este ensayo, se encontró que con el aumento del tiempo de extracción de grasa a 24 h y el cambio de disolvente cada 8 h, se logró incrementar el contenido de grasa extraída del endospermo en un 31 %. Se han reportado 20-22 % de grasa total en semilla de *A. muricata* (Onimawo, 2002; Fasakin *et al.*, 2008); sin embargo, los tiempos de extracción de grasa usados son de 6 h, por lo que la cantidad de grasa reportada es menor a lo encontrado en este experimento.

Con las condiciones de desengrasado usadas en este ensayo, se demostró que no hubo presencia de lípidos en los extractos acetogénicos debido a que ya no se presentó turbidez cuando se indujo la reacción de Kedde, por lo que se realizó la cuantificación de ACGs, sin interferencias. En el Tabla 3 se muestran los resultados de la cuantificación de ACGs. Hubo efecto significativo ($p < 0.05$) del número de veces de extracción. El mayor contenido de ACGs se obtuvo en la primera extracción cuando se utilizó metanol como disolvente, después disminuyó gradualmente conforme avanzó el número de extracciones; mientras que con el acetato de etilo, el contenido de ACGs fue estadísticamente igual en las primeras tres extracciones y después disminuyó significativamente. Respecto al tipo de solvente, también se observó un efecto significativo ($p < 0.05$); estadísticamente fue mayor el CAT cuando se utilizó metanol en la primera extracción; solo en la tercera extracción fue mayor el CAT con acetato de etilo. No obstante, la cantidad final de ACGs fue mayor cuando se utilizó metanol (25.60 mg/g bs), respecto a cuando se usó acetato de etilo (23.62 mg/g bs). Estos resultados se deben a que las ACGs extraídas del endospermo con EAU, son mayormente polares, debido a que las ACGs se extrajeron en mayor cantidad en la primera y segunda extracción con metanol

Tabla 3. Contenido de acetogeninas totales (mg/g bs) obtenidas con extracción asistida con ultrasonido, cinco extracciones consecutivas y dos solventes (metanol y acetato de etilo), a partir de endospermos desengrasados (24 h) de *A. muricata*.

Table 3. Total acetogenin content (mg/g bs) obtained with ultrasound-assisted extraction, five consecutive extractions and two solvents (methanol and ethyl acetate), from *A. muricata* defatted endosperms (24 h).

Número de extracciones	Extracción con metanol	Extracción con acetato de etilo
1	10.76 ± 0.02 ^{av}	5.45 ± 0.08 ^{bv}
2	5.77 ± 1.90 ^{aw}	6.96 ± 1.61 ^{av}
3	4.27 ± 0.09 ^{aw}	6.84 ± 1.45 ^{bv}
4	2.71 ± 1.13 ^{ax}	2.81 ± 0.98 ^{aw}
5	2.08 ± 0.99 ^{ax}	1.56 ± 0.01 ^{ax}
Contenido total de acetogeninas (mg/g bs)	25.60 ± 0.78 ^a	23.62 ± 0.74 ^b

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar ($n=3$). Letras diferentes en la misma fila (a, b) indican diferencias estadísticas significativas por efecto del disolvente para cada extracción y las letras diferentes en la misma columna (w, x, y, z) indican diferencias estadísticas significativas por efecto del número de extracción con el mismo disolvente ($\alpha=0.05$).

(Morales *et al.*, 2004); aunque se requiere de 4 h de extracción con ultrasonido.

Comparando el CAT de semillas de *A. muricata* reportado en otros estudios, se encontró que Gromek *et al.* (1994) informaron un contenido de ACGs totales de 10-10.07 mg/g bs después de utilizar como solvente metanol y el método de maceración. Por su parte, Yang *et al.* (2009, 2010) reportaron un contenido de ACGs de 1.67-2.09 mg/g utilizando la extracción FSC; mientras que Aguilar-Hernández *et al.* (2020), usando la EAU con cloroformo reporta 13 mg/g bs. Por ende podemos asumir que con este tercer ensayo, se encontró una mejor alternativa para aumentar el rendimiento de extracción de ACGs a partir de semillas de *A. muricata*.

Cuantificación por HPLC e identificación por RMN de ACGs aisladas del endospermo desengrasado

En la Tabla 4 se puede observar los resultados de la cuantificación de ACGs aisladas por HPLC-DAD, en cada fracción obtenida. Las ACGs con mayor abundancia fueron dos ACGs: annonacina y pseudoannonacina, éstas fueron aisladas y cuantificadas. De acuerdo a Champy *et al.* (2009), la annonacina es una de las acetogeninas más abundantes en *A. muricata*; sin embargo, la pseudoannonacina no ha sido reportada en semillas de esta especie, por lo que este es el primer estudio donde se reporta. Cabe mencionar que se detectaron más compuestos acetogénicos en las fracciones pero en baja abundancia.

Tabla 4. Cuantificación de annonacina y pseudoannonacina en fracciones ricas en acetogeninas obtenidas a partir del endospermo de las semillas de guanábana, usando extracción asistida con ultrasonido y metanol como solvente de extracción.

Table 4. Quantification of annonacin and pseudoannonacin in acetogenin-rich fractions obtained from soursop seed endosperm, using ultrasound-assisted extraction and methanol as extraction solvent.

Fracción	Annonacina (µg/g bs de endospermo)	Pseudoannonacina (µg/g bs de endospermo)
F1	6672.07 ± 36.29 ^a	4341.71 ± 81.11 ^a
F7	2095.08 ± 33.26 ^b	1792.38 ± 21.55 ^b
Total	8767.15 ± 2.14 ^a	6134.10 ± 45.37 ^b

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). bs= base seca.

La mayor concentración de ACGs se encontró en la fracción F7, siendo la annonacina la ACG predominante. Esto se debe a que para obtener esa fracción rica en ACGs, se usó una mezcla de separación mayormente polar. El contenido total de annonacina y de pseudoannonacina en el endospermo fue de 8767.15 y 6134.10 µg/g bs, respectivamente. El contenido de annonacina fue mayor a los reportes descritos por Wurangian (2005) y Ranisaharivony *et al.* (2015), quienes encontraron 450 µg/g bs y 470 µg/g de annonacina extraída de semillas de *A. muricata*, respectivamente; utilizando el método soxhlet con etanol como disolvente.

En la Figura 1(a) se muestra el espectro de RMN ¹H de las ACGs aisladas por HPLC semi-preparativo. Se pueden observar las expansiones de las señales anchas típicas del protón vinílico (δ 6.96-7.25, H-33), las señales cuádruples de las bases de oxígeno (δ 4.90-5.15, H-34) y las señales dobles del grupo metilo secundario (δ 1.32-1.46, H-35) ubicados en el anillo de la lactona. La integración de las resonancias de los protones vinílicos (H-33) y base de oxígeno (H-34) demuestran que se trata de las ACGs: annonacina y la pseudoannonacina y que corresponden para una proporción 73:27, respectivamente.

En la Figura 1(b) se muestra el espectro de RMN ¹³C de las ACGs aisladas, en ella se pueden apreciar las señales características del anillo de la lactona terminal de las ACGs: en δ 174.8 (C-1) la señal del carbonilo de la lactona, en δ 152.1 (C-32) y 130.9 (C-2) se observan las señales del doble enlace CH=C, en δ 78.1 se encuentra la señal del grupo CH (C-34) base del metilo y oxígeno, mientras que la señal del metilo secundario aparece en δ 14.1 (C-35).

El espectro de correlación homonuclear (COSY) (Figura 1c) permitió establecer las correlaciones de las señales cuádruples que confirman la presencia de un anillo THF en

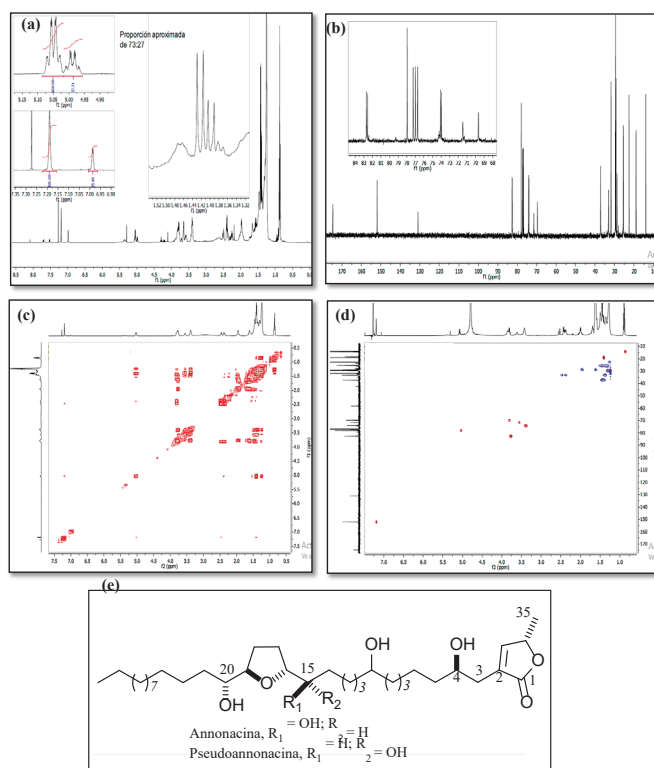


Figura 1. Espectros obtenidos por resonancia magnética nuclear (RMN) de acetogeninas aisladas por HPLC semi-preparativo. (a) Espectro de RMN ¹H. (b) Espectro de RMN ¹³C. (c) Correlación homonuclear (COSY). (d) Correlación heteronuclear (HSQC). (e) Estructuras con estereoquímica relativa de la annonacina y la pseudoannonacina.

Figure 1. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of acetogenins isolated by semipreparative HPLC. (a) ¹H NMR spectrum. (b) ¹³C NMR spectrum. (c) Homonuclear correlation (COSY). (d) Heteronuclear correlation (HSQC). (e) Structures with relative stereochemistry of annonacin and pseudoannonacin.

las ACGs (δ 3.2-3.8). Las correlaciones de los protones base de oxígeno del anillo THF con los multipletes cercanos a 1.63 y 1.32 ppm son las pertenecientes a los metilenos del mismo anillo (CH_2 -17 y CH_2 -18). La presencia del grupo OH en C-4 se confirmó por la correlación entre el grupo metileno (δ 2.25 y 2.75, CH_2 -3) con la base de oxígeno que aparece cerca de δ 3.75, la cual pertenece a H-4.

El espectro de correlación heteronuclear a un enlace (HSQC) (Figura 1d) permitió asignar el número de carbonos protonados, entre los que destacan aquellos que soportan grupos funcionales (doble enlace, bases de oxígeno), los adyacentes a estos grupos y los grupos metilenos de las ACGs. La estereoquímica relativa de los centros estereogénicos C-15, C-16, C-19 y C-20 se determinó aplicando la regla de Curran (Curran *et al.*, 2006). En su conjunto, los experimentos de RMN mencionados permitieron determinar que las estructuras de este par de acetogeninas corresponden a la annonacina y la pseudoannonacina (Figura 1e), previamente aisladas de *A. muricata*.

CONCLUSIONES

Con los disolventes acetato de etilo y metanol se observó una mayor presencia de ACGs. Con la EAU se logró reducir significativamente el tiempo de extracción (~ 5 veces) y una mayor presencia de ACGs extraídas, comparando con el método Soxhlet. El desengrasado del endospermo de la semilla de *A. muricata*, el uso de metanol como solvente y la tecnología de ultrasonido (0.75 s pulso-ciclo y 100 % amplitud), con hasta cinco extracciones consecutivas de 50 min cada una, aumentaron el rendimiento de la extracción de ACGs hasta 2.5 %. Las ACGs aisladas en mayor concentración, fueron la annonacina y pseudoannonacina y este es el primer reporte donde se identificó esta última acetogenina. Con este estudio se destaca que las semillas de *A. muricata* son una fuente rica en acetogeninas y que la EAU es una alternativa tecnológica eficiente para extraer estos compuestos bioactivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Tecnológico Nacional de México (5089.19-P) y al CONACyT-México por la beca de postdoctorado otorgada a la Dra. Gabriela Aguilar-Hernández. Este trabajo forma parte de las actividades de la RED TEMÁTICA CONACYT 12.3, Reducir y Valorizar las Pérdidas y Desperdicios de Alimentos: Hacia Sistemas Alimentarios Sustentables.

REFERENCIAS

- Aguilar-Hernández, G., Vivar-Vera, M.D.L.A., García-Magaña, M.D.L., González-Silva, N., Pérez-Larios, A. y Montalvo-González, E. 2020. Ultrasound-assisted extraction of total acetogenins from the soursop fruit by response surface methodology. *Molecules*. 25: 1-10. <https://doi.org/10.3390/molecules25051139>
- Al-Dhabi, N.A., Pomurugan, K. y Maran, P. 2016. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 206-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18ª ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Bermejo, A.; Figadère, B.; Zafra-Polo, M.C.; Barrachina, I.; Estornell, E. y Cortes, D. 2005. Acetogenins from Annonaceae: Recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Products Reports*. 22: 269-303. <http://doi.org/10.1039/b500186m>
- Cavé, A.; Figadère, B.; Laurens, A. y Cortés, D. Acetogenins from Annonaceae. 1997. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, pp. 81-287. Springer: New York, NY, USA. http://doi.org/10.1007/978-3-7091-6551-5_2
- Champy, P., Höglinger, G. U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprevote, O., Medja, F., Lombes, A., Michel, P. P., Lannuzel, A., Hirsch, E. C. y Ruberg, M. 2004. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of Neurochemistry*. 88: 63-69. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02138.x>
- Coria-Téllez, A.V., Montalvo-González, E., y Obledo-Vázquez, E.N. 2018. Soursop (*Annona muricata*). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*; E. Yahia (ed.), pp 1243-1252. John Wiley & Sons Inc: Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch66>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S. y Abert-Vian, M. 2017. Ultrasound-assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 540-560. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Curran, D.P., Zhang, Q., Lu, H., y Gudipati, V. 2006. On the proof and disproof of natural product stereostructures: Characterization and analysis of a twenty-eight member stereoisomer library of murisolin and their mosher ester derivatives. *Journal of the American Chemical Society*. 128: 9943-9956. <http://doi.org/10.1021/ja062469l>
- Duran-Ruiz, C.A., Cruz-Ortega, R., Zaldívar-Riverón, A., Zavaleta-Mancera, H.A., De-la-Cruz-Chacón, I. y González-Esquinca, A.R. 2019. Ontogenic synchronization of *Bephratelloides cubensis*, *Annona macrophyllata* seeds and acetogenins from Annonaceae. *International Journal of Plant Research*. 132: 81-91. <https://doi.org/10.1007/s10265-018-01078-3>
- Fasakin, A. O., Fehintola, E. O., Obijole, O. A., y Oseni, O. A. 2008. Compositional analyses of the seed of soursop, *Annona muricata* L., as a potential animal feed supplement. *Scientific Research and Essay*. 3:521-523. <http://www.academicjournals.org/SRE>
- Gromek, D., Hocquemiller, R. y Cavé, A. 1994. Qualitative and quantitative evaluation of annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*. 5: 133-140. <https://doi.org/10.1002/pca.2800050309>
- Guedes, A.M.M., Antoniassi, R. y de Faria, M.A.F. 2017. Pequi: una fruta brasileña con usos potenciales para la industria de grasas. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*. 24: 1-4. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017040>
- Hassan, S., Adam, F., Abu Bakar, M.R. y Abdul Mudalip, S.K. 2018. Evaluation of solvents' effect on solubility, intermolecular

- interaction energies and habit of ascorbic acid crystals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 23: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.07.002>
- Ketenoglu, O. 2020. Extraction of peanut oil using thermosonication: modeling and multiobjective optimization of process parameters using Box–Behnken design. *Journal of Oleo Science*. 69: 585-595. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19309>
- Kumar, K., Srivastav, S. y Sharanagat, V.S. 2020. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics –Sonochemistry*. 70: 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2020.105325>
- León-Fernández, A.E., Obledo-Vázquez, E.N., Vivar-Vera, M.A., Sayágo-Ayerdi, S.G. y Montalvo-González, E. 2016. Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 39: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017358>
- Mohammadpour, H., Sadrameli, S.M., Eslami, F. y Asoodeh, A. 2019. Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. *Industrial Crops and Products*. 131: 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.030>
- Morales, C.A., González, R. y Aragón, R. 2004. Evaluación de la actividad larvívica de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Dipeta: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 30: 187-192. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v30n2/v30n2a10.pdf>
- Neske, A., Hidalgo, J. R., Cabedo, N. y Cortes, D. 2020. Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. *Phytochemistry*. 174: 112332. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112332>
- Proaño, F., Stuart, J. R., Chongo, B., Flores, L., Herrera, M., Medina, Y. y Sarduy, L. 2015. Evaluación de tres métodos de saponificación en dos tipos de grasas como protección ante la degradación ruminal bovina. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 49: 35-39. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802015000100006
- Ranisaharivony, B.G., Ramanandraibe, V., Rasoanaivo, L.H., Rakotovoao, M. y Lemaire, M. 2015. Separation and potential valorization of chemical constituents of soursop seeds. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4: 161-171.
- Rupprecht, J. K., Hui, Y. H. y McLaughlin, J. L. 1990. Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products*. 53: 237-278. <https://doi.org/10.1021/np50068a001>
- Onimawo, I. A. 2002. Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of soursop (*Annona muricata*). *Plant Foods for Human Nutrition*. 57: 165-171. <https://doi.org/10.1023/a:1015228231512>
- Sawada, M. M., Venâncio, L. L., Toda, T. A., Rodrigues, C. E. 2014. Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal. *Food Research International*. 62: 662-670. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.039>
- Silva, P.B., Mendes, L.G. y Rehder, A.P.B. 2020. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Acerola* waste. *Journal of Food Science and Technology*. 57: 4627-4636. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04500-8>
- Soto, R., Svård, M., Verma, V., Padrela, L., Ryan, K. y Rasmuson, A. C. 2020. Solubility and thermodynamic analysis of ketoprofen in organic solvents. *International Journal of Pharmaceutics*. 588: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119686>
- Wurangian, F. L. 2005. Determination of annonacin compound by high performance liquid chromatography on the extract of *Annona muricata* Linn seed for pesticide formula. *Indonesian Journal of Chemistry*. 5: 215-218. <https://doi.org/10.22146/IJC.21792>
- Yang, H., Li, X., Tang, Y., Zhang, N., Chen, J. y Cai, B. 2009. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC–DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 49: 140-144. <https://doi.org/10.1016/j.jfitote.2009.01.005>
- Yang, H., Zhang, N., Zeng, Q., Yu, Q., Ke, S. y Li, X. 2010. HPLC Method for the simultaneous determination of ten annonaceous acetogenins after supercritical fluid CO₂ extraction. *International Journal of Biomedical Science*. 4: 202-207.

Behavior of the volatile compounds regulated by the Mexican Official Standard NOM-070-SCFI-2016 during the distillation of artisanal Mezcal

Comportamiento de los compuestos volátiles regulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016 durante la destilación de Mezcal artesanal

Nolasco-Cancino H¹, Jarquín-Martínez D¹, Ruiz-Terán F², Santiago-Urbina JA^{3*}

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Av. Universidad S/N, CP 68120, Ex-Hacienda 5 Señores, Oaxaca de Juárez, México.

² Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, Ciudad de México, México

³ Dirección de División de Carrera de Agricultura Sustentable y Protegida, Universidad Tecnológica de los Valles Centrales de Oaxaca, Villa de San Pablo Huixtepec, CP 71270, Zimatlán, Oaxaca, México.

RESUMEN

El mezcal se produce por fermentación del jugo de maguey y doble destilación en alambiques de cobre. Durante la segunda destilación, el destilado se separa en tres cortes o fracciones: cabeza, cuerpo y cola. El presente estudio tuvo como objetivo determinar el progreso de los compuestos volátiles regulados por la NOM-070-SCFI-2016 durante la primera y segunda destilación. Se recolectaron alícuotas directamente del flujo del destilado de un lote de mezcal artesanal y se analizaron por cromatografía de gases y densímetro digital. La fracción cabeza se colectó de 77.71 a 74.30 % (v/v) de etanol, la fracción cuerpo hasta 28.83 % (v/v), la fracción cola hasta 14.44 % (v/v). El primer litro de cada fracción contenía 1731.86, 656.54 y 102.6 mg/100 mL a.a. (alcohol anhidro) de ésteres; 421.21, 452.28 y 40.26 mg/100 mL a.a. de alcoholes superiores; 72.86, 35.37 y 1.77 mg/100 mL a.a. de aldehídos; 135.33, 142.95 y 247.6 mg/100 mL a.a. de metanol; 0.30, 0.45 y 3.04 mg/100 mL a.a. de furfural. Los alcoholes superiores, ésteres y aldehídos predominaron al inicio de la destilación, mientras que el furfural y el metanol prevalecen al final. Estos resultados serán de utilidad para los Maestros mezcaleros, contribuyendo a un mejor control de calidad del Mezcal.

Palabras clave: mezcal artesanal, destilación, compuestos volátiles, cortes de la destilación.

ABSTRACT

Mezcal is produced by the fermentation of maguey juice followed by a double distillation in copper stills. During the second distillation, three distillate cuts or fractions are separated: head, heart, and tail. The present study aimed to determine the progress of those volatile compounds regulated by the NOM-070-SCFI-2016 during the first and second distillation process. Aliquots were collected directly from the distillate flow of the artisanal Mezcal batch and analyzed by gas chromatography and digital densitometer. The head fraction was collected from 77.71 to 74.30 % (v/v) of ethanol, the heart fraction to 28.83 % (v/v), and the tail fraction

collected until 14.44 % (v/v). The first liter of each fraction contained 1731.86, 656.54, and 102.6 mg/100 mL a.a. (anhydrous alcohol) of esters; 421.21, 452.28, and 40.26 mg/100 mL a.a. of higher alcohols; 72.86, 35.37, and 1.77 mg/100 mL a.a. of aldehydes; 135.33, 142.95, and 247.6 mg/100 mL a.a. of methanol; 0.30, 0.45, and 3.04 mg/100 mL a.a. of furfural. Higher alcohols, esters, and aldehydes predominate at the beginning of the distillation, while furfural and methanol prevail at the end. These results will be useful for the Maestros mezcaleros, contributing to a better quality control of Mezcal.

Keywords: artisanal Mezcal, distillation, volatile compounds, distillation cuts.

INTRODUCTION

Mezcal is a traditional Mexican spirit, it is obtained by distillation of fermented maguey juice and produced in the territory protected by the Appellation of Origin Mezcal (NOM-070-SCFI-2016). Mezcal is classified into three categories: Ancestral Mezcal, Artisanal Mezcal, and Mezcal (NOM-070-SCFI-2016). From these, Artisanal Mezcal is the most produced, with 86 % (6,747,775 L) of the total production (2021 statistical report; Mezcal Regulatory Council, 2021).

All categories of Mezcal must meet specific chemical parameters for its commercialization. According to the Mexican Official Standards NOM-070-SCFI-2016, Mezcal should have an alcohol concentration of 35 to 55 % by volume at 20°C; the higher alcohols and methanol concentrations must be within the limits of 100-500 mg/100 mL of anhydrous alcohol (a.a.) and 30-300 mg/100 a.a., respectively. The maximum limits permitted for aldehydes and furfural are 40 and 5 mg/100 mL a.a., respectively.

In Artisanal Mezcal production, piñas of maguey are cooked in a pit oven for 3 to 5 days, where the maguey fructans are hydrolyzed into fermentable sugars. Then, cooked maguey is milled using a tahona. After that, bagasse (pulp and fiber) obtained by the milling of cooked maguey is placed in 1000 L wooden vats, followed by the addition of

*Autor para correspondencia: Jorge Alejandro Santiago Urbina
 Correo electrónico: jorgesantiago.urbina@gmail.com

Recibido: 22 de septiembre de 2021

Aceptado: 27 de enero de 2022

water (Nolasco-Cancino *et al.*, 2018); sugars in maguey must undergo a spontaneous fermentation. Finally, the fermented maguey juice is double distilled in 300 L copper still. Firstly, the copper boiler is filled with fermented juice plus bagasse in an approximately relation of 1.5:1. Subsequently, it is heated with direct flame fueled by regional wood or butane to obtain the first distillate named “simple,” “shishe” or “ordinario” which is then brought back to the boiler for a second distillation to obtain three distillate fractions: head, heart, and tail. These fractions are performed based on the experiences of the Maestros mezcaleros. They measure the alcohol content in the distillate using a traditional method, which consists of inspecting the lifetime of bubbles (regionally known as pearls) that are formed by a stream of the distillate poured into a “jícara” (small wooden cup, made from the bark of the *Crescentia alata* fruit). This empirical method helps measure ethanol concentrations close to 50 % v/v (Rage *et al.*, 2020). Also, distillation cuts are determined by smelling and tasting the distillate. The producers are guided by the herbaceous, fruity, and alcoholic aromas and flavors. In many cases, when producers are in the certification process and have not received training on the artisanal distillation process, mezcals can contain high levels of furfural, higher alcohols, and methanol mainly.

Some studies have been done to understand the distribution of volatile compounds during the distillation process in alcoholic beverages, such as plum brandies, Maotai liquor, spirit from Spine grape (Spaho *et al.*, 2013; Balcerk *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2020). These authors have reported that higher alcohols, aldehydes, and most esters predominate in the head fraction. While, in tail fraction, furfural and methanol occur in significant quantities (Balcerk *et al.*, 2017). Although the absolute concentration of these volatile compounds varies between distillates, their behavior during the distillation process is the same. In the distillation of tequila and cocuy de pecaya (agave spirits), these volatile compounds also have the same behavior as in the spirits mentioned above (Prado-Ramírez *et al.*, 2005; Granadillo *et al.*, 2007). In Mezcal, no studies have been carried out that allow us to know the chemical compounds’ behavior throughout the artisanal distillation process.

The objective of this work was to determine the behavior of the ethanol, methanol, higher alcohols, esters, furfural, and aldehydes compounds during the first and second distillation processes. This information helps to provide recommendations to artisanal producers to efficiently control the distillation cuts and certify and mark their Mezcal.

MATERIALS AND METHODS

Sampling site

Samples of distillate were collected during the mezcal production process in Danzantes factory, an artisanal distillery located in Santiago Matatlán, Oaxaca, Mexico. Samples were taken during the distillation progress of a batch of artisanal Mezcal.

Fermentation

Mezcal was made by a Maestro mezcalero of the Danzantes distillery, following their traditional process. The batch of mezcal was produced using maguey espadín (*Agave angustifolia*). Cooked and crushed maguey pineapples (pulp and fiber) plus water were poured into a 1000 L wooden vat in a 60:40 (maguey: water) ratio. Fermentation was carried out naturally (no yeast addition) for approximately eight days.

Distillation and sample collection

First distillation

Immediately upon completion of fermentation, distillation was carried out in a 300 L copper still. The copper boiler was filled with 150 L of fermented maguey juice plus 100 kg of bagasse (pulp and fiber of the fermented maguey). It was heated with direct flame fueled by butane to obtain the first distillation named “ordinario”. This process was monitored in two stills to understand the behavior of normative compounds in the first distillation. During distillation, the flow rate was maintained approximately at 206 and 217 mL/min in each still. The first distillation was stopped according to the recommendation and experience of the Maestro mezcalero. The distillate is stored in food-grade plastic containers to be subjected to a second distillation subsequently.

A total of 24 aliquots were directly collected from the distillate flow of each still (in this study 2 stills were sampled). An aliquot consisted of a 100 mL sample for each liter of distillate. Samples were collected in 100 mL plastic bottles and stored at 4°C until analysis.

Second distillation

To know the behavior of the normative compounds in the second distillation and identify the distillate cuts, 250 L of ordinario were redistilled and fractionated in the head, heart, and tail. The ordinario was placed in the copper boiler and heated with direct flame fueled by butane. During distillation, the flow rate was maintained at approximately 170 mL/min. In this process, the Maestro mezcalero, according to his experience, made the distillate cuts (head, heart, and tail fractions). The head fraction consisted of the first 9 L distillate. Then, 86 L distillate were collected as the heart fraction. After that, the distillate was collected as the tail fraction comprised 12 L. Each fraction was stored in food-grade plastic containers until adjusting the alcoholic graduation and bottling.

In this stage, 109 aliquots were directly collected from the distillate flow of a single still. Samples 1 to 9 corresponded to the head fraction; samples 10 to 96 were collected from the heart fraction, and samples 97 to 109 were collected from the tail fraction. Samples were collected in 100 mL plastic bottles and stored at 4°C until analysis.

ANALYTICAL METHODS

Ethanol determination

Ethanol concentration was determined as indicated by the Mexican norm (NMX-V-013-NORMEX-2013) at 20°C, using an Anton Paar digital densitometer (Anton Paar, DMA

4100M, Switzerland). One milliliter of the sample was injected into the digital densitometer, and the values were recorded. Samples were analyzed in triplicate.

Volatile compounds determination

The compounds regulated by NOM-070-SCFI-2016 were analyzed following the methodology described in the Mexican standards NMX-V-005-NORMEX-2013 (aldehydes, esters, methanol, and higher alcohols) and NMX-V-004-NORMEX-2013 (furfural).

The concentrations of methanol, higher alcohols (1-pentanol, isoamyl alcohol, n-butanol, isobutyl alcohol, 2-butanol, and 1-propanol), esters (ethyl acetate and ethyl lactate), aldehydes (acetaldehyde), and furfural were determined in a gas chromatograph (Shimadzu GC-2010Plus). It was equipped with automatic injection (Shimadzu, ADC-20i), a flame ionization detector (FID), and a CP-WAX 52 CB (50 m x 0.32 mm) column. Injector temperature was 250°C, and detection by FID at a temperature of 450°C. The gas chromatography oven temperature was 250°C. Nitrogen was used as the carrier gas at a 40 mL/min flow rate, air 400 mL/min, and hydrogen 40 mL/min.

Samples were adjusted at 20°C and placed in a 50 mL volumetric flask, then 1 mL of internal standard solution (2-pentanol; Sigma-Aldrich) was added. This solution was placed in 1 mL vials, and one μ L of the sample was injected by automatic injection. To identify and quantify volatile compounds, certified standards (Chem Service, Inc., and AccuStandard®) were used, and calibration curves were performed for each compound.

Statistical analysis

During the first distillation, 24 samples of "ordinario" were collected from two stills, and mean values and standard deviations were calculated. The normality of the data for each variable (ethanol, aldehydes, higher alcohols, esters, furfural, and methanol) was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov normality test. Continuous quantitative variables were transformed using the expression $((x) + 1)^{1/2}$, while the data reported as percentages were transformed using $\arcsin(x/100)^{1/2}$ to obtain a better fit in the normality of the data. Then, the behavior of the volatile compounds was compared between stills using a t-test ($p \leq 0.05$) of two independent samples.

On the other hand, one-way ANOVA followed by Fisher LSD test ($p \leq 0.05$) was used to evaluate whether significant differences existed between the concentration of ethyl acetate, ethyl lactate, 2-butanol, n-propanol, isobutyl alcohol, n-butanol, isoamyl alcohol, and amyl alcohol from the samples collected during the first distillation. The data obtained in the second distillation were not statistically analyzed as the number of performed distillations was not sufficient (distillation samples were collected from a single still). The still contained the "ordinarios" previously analyzed. All statistical analysis were performed with the statistical package Minitab Statistical Software V.19.

RESULTS AND DISCUSSION

Mezcal has a complex volatile compounds composition which contributes to its organoleptic profile (Vera-Guzmán *et al.*, 2018). During the distillation process, these compounds are separated from the must according to their boiling point, solubility in alcohol or water, variation of alcohol content in the vapor and liquid phases (Xiang *et al.*, 2020), and by the distillation equipment employed (Balcerek *et al.*, 2017). Distillation is a critical stage where normative compounds can be controlled through appropriate distillate cuts.

Ethanol behavior

During the first distillation, ethanol and volatile compounds are separated from the fermented maguey must. Therefore, two products are obtained at this stage: a) the distillate named ordinario and b) vinasses or waste.

The behavior of the ethanol concentration and volatile compounds was similar between stills (no statistical differences were found with t-test, $p \leq 0.05$). Figure 1a shows the behavior of ethanol during the first distillation process. The ethanol concentration was 45.34 ± 5.07 % (v/v) in the first liter of distillate. This alcoholic strength decreased during the distillation progress. Thus, the last liter of the ordinario sample collected (sample 24) had an ethanol concentration of 12.61 ± 1.71 % (v/v). In artisanal distilleries, the producer defines the volume of ordinario collected based on their

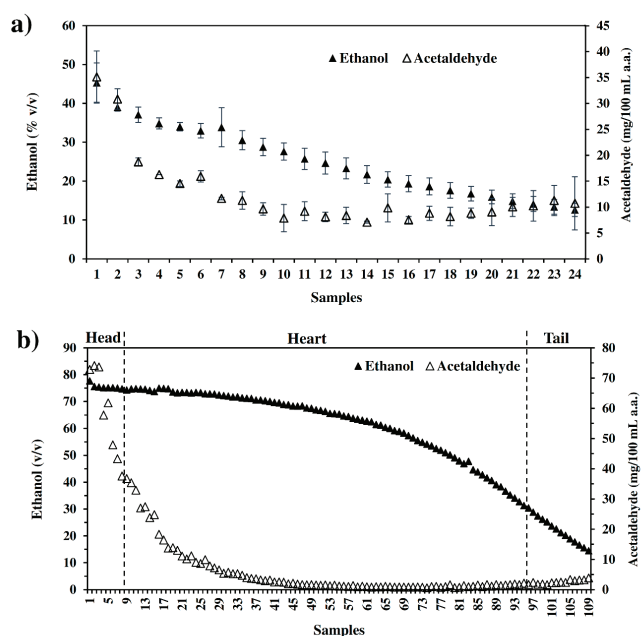


Figure 1. Behavior of ethanol and acetaldehyde during the first (a) and second (b) distillation of artisanal Mezcal. The vertical dotted lines on figure "b" indicate the distillate cuts. In figure "a", concentration values are given as the mean of the samples from two copper stills \pm standard deviation.

Figura 1. Comportamiento del etanol y acetaldehído durante la primera (a) y segunda (b) destilación del Mezcal artesanal. Las líneas punteadas verticales en la figura "b" indican los cortes del destilado. En la figura "a", los valores de las concentraciones se dan como la media de las muestras de dos alambiques de cobre \pm desviación estándar.

experiences. The ethanol content in the ordinario mainly depends on its concentration in the fermented must. It has been reported that ethanol concentration in maguey fermentation is approximately between 4 and 6 % v/v (Kirchmayr *et al.*, 2017).

In the second distillation, the distillate was separated into three fractions: head, heart, and tails (Figure 1b). These fractions consisted of approximately 3.6 % (9 L), 34.4 % (86 L), and 4.8 % (12 L), respectively, of the base ordinario volume (250 L) placed in the boiler. The ethanol concentration in the head fraction ranged from 77.71 % (sample 1) v/v to 74.3 % v/v (sample 9; Figure 1b). Then, the heart fraction was collected from the samples 10 to 96, starting with 74.72 % (v/v) of ethanol, and its content was reduced as the distillation process progressed. The last liter of the heart fraction (sample 96) had an alcohol content of 30.39 % v/v (Figure 1b). After that, the distillate was collected as the tail fraction until sample 109, where the ethanol content was 14.44 % v/v (Figure 1b). The heart fraction was separated in other studies with spirits until alcohol content dropped under 55 % (v/v), and the tail fraction was collected until ethanol was lower than 30 % v/v (Xiang *et al.*, 2020). In experiments with plum brandies, the heart's fraction was cut until the alcohol reached a concentration of 40, 45, or 50 % v/v (Spaho *et al.*, 2013), while in tequila it has been suggested to collect the heart fraction up to 35% (v/v) of ethanol (Prado-Ramírez *et al.*, 2005). These distillate cuts will define the quality of the spirits because these may have more or less compounds regulated by the laws of each country.

The heart fraction is what becomes the finished product, and the producer adds drinking or demineralized water to adjust the alcohol content in the range established by the NOM-070-SCFI-2016 (35-55 % v/v at 20°C). According to the production practices in the distillery, some producers use a fair number of heads and tails to adjust the alcohol content and accentuate some aromas in the distillate. However, this practice frequently increases the concentration of some compounds regulated by Mexican standards, such as methanol and furfural (when tails are used), higher alcohols, and aldehydes (when heads are used). On the other hand, the most experienced Maestros mezcaleros redistilled the heads and tails fractions in another batch to collect more alcohol. Also, some producers use these distillation fractions to produce mixed beverages and distillates of lower quality.

Aldehydes

In spirit, some aldehydes such as isobutanal, 2-methylbutanal, and furfural are thermally formed during the first step of distillation (Awad *et al.*, 2017). In contrast, others like acetaldehyde are formed during the lag and the onset of yeast growth phases and ethanol oxidation (Jackowitz *et al.*, 2011). This metabolite in low concentration can give a fruity character to alcoholic beverages; nevertheless, in higher concentration, it provides a negative effect on sensory characteristics causing a pungent smell (Balcerek *et al.*, 2017).

In Mezcal, acetaldehyde should not exceed 40 mg/100 mL of ethanol 100 % (v/v). This metabolite is quantitated according to the standard Mexican norm NMX-V-005-NORMEX-2013, which establishes that this compound is the most abundant of the aldehydes in alcoholic beverages, which is why only this is considered when reporting aldehydes. Although acetaldehyde is water-soluble, it has a boiling point of 20.4°C; therefore, it was found mainly at the beginning of the distillation process. In the first liter of ordinario, this metabolite had a concentration of 35.11±5.03 mg/100 mL a.a. (Figure 1a). This value rapidly decreased during the first nine liters of distillate, reaching a concentration of 9.64 mg/100 mL a.a., which remained almost constant during distillation progress (Figure 1a). It is probably by the solubility both in ethanol and water.

During the second distillation, acetaldehyde showed similar behavior to that of the first distillation (Figure 1b). However, the acetaldehyde content was higher in the head fraction (from 72.82 to 36.77 mg/100 mL a.a.) than in the heart and tail (Figure 1b). This result is according to the reported by Balcerek *et al.* (2017). The first liter of heart fraction had an acetaldehyde concentration of 35.37 mg/100 mL a.a. The last liter collected from this fraction had 1.72 mg/100 mL a.a. (Figure 1b). The tail fraction was characterized by the low content of this metabolite (2.39 to 3.87 mg/100 mL a.a.). Similar acetaldehyde concentration in the tail fraction was reported by Alcarde *et al.* (2011).

The results indicate that Mezcal (heart fraction) will comply with the permissible limit of aldehydes as established by the NOM-070-SCFI-2016.

Higher alcohols

Figure 2a shows the higher alcohols and esters concentrations obtained from the samples collected during the first distillation process. NOM-070-SCFI-2016 through NMX-V-005-NORMEX-2013 establishes that the higher alcohol concentration corresponds to the sum of 2-butanol, n-propanol, isobutyl alcohol, n-butanol, isoamyl alcohol, and amyl alcohol. Among them, isoamyl and isobutyl alcohols were present with the highest concentration (Table 1). These alcohols also were predominant in plum brandies (Spaho *et al.*, 2013). However, in this spirit, 1-propanol has been reported as the principal higher alcohol (Spaho *et al.*, 2013; Balcerek *et al.*, 2017). This difference is probably due to the raw material used to produce each spirit, which can contain different amino acids and therefore promote the synthesis of different higher alcohols.

In general, higher alcohols were abundant at the beginning of the distillation. The first liter of ordinario had a concentration of 575.805±58.85 mg of higher alcohols/100 mL a.a. (Figure 2a), 95 % of them consisted of isobutyl and isoamyl alcohol (Table 1). Despite the high boiling temperature of these alcohols (isobutyl alcohol, 108°C; and isoamyl alcohol, 131°C), they were predominant in the head fraction (Fisher LSD test, $p \leq 0.05$). This is probably due to their low solubility in water (Léauté, 1990) and high affinity to ethanol,

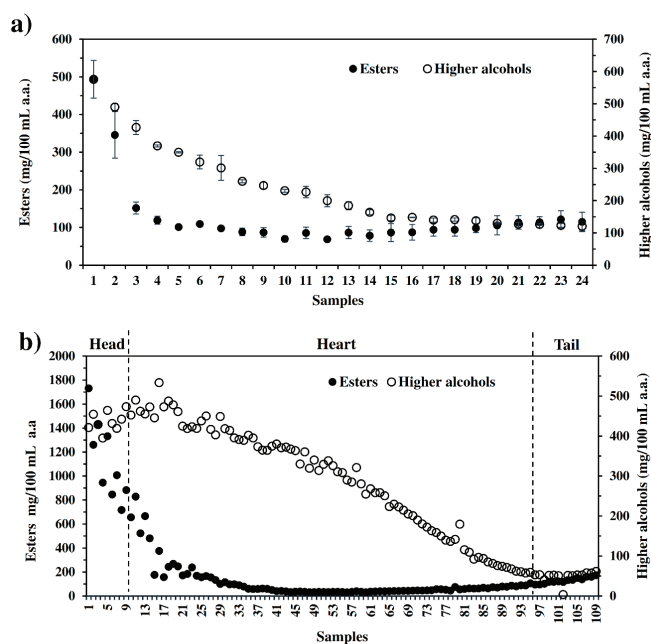


Figure 2. Behavior of higher alcohols and esters during the first (a) and second (b) distillation of artisanal Mezcal. The vertical dotted lines on figure "b" indicate the distillate cuts. In figure "a", concentration values are given as the mean of the samples from two copper stills \pm standard deviation.

Figura 2. Comportamiento de alcoholes superiores y ésteres durante la primera (a) y segunda (b) destilación del Mezcal artesanal. Las líneas punteadas verticales en la figura "b" indican los cortes del destilado. En la figura "a", los valores de las concentraciones se dan como la media de las muestras de dos alambiques de cobre \pm desviación estándar.

forming azeotropic mixtures so that they can distill together with ethanol (Xiang *et al.*, 2020). Isoamyl alcohol had the highest concentration throughout the entire distillation. This higher alcohol is synthesized by leucine metabolism through the Ehrlich route performed by yeast cells (Loviso and Libkind, 2019). Thus, the higher alcohol concentration in the distillate could be influenced by raw material (maguey

species), yeasts, fermentation conditions, distillation techniques, experiences of the mezcal producers, and others.

In the second distillation, the head fraction was characterized by a high concentration of higher alcohols (450 mg/100 mL a.a., approximately, Figure 2b), mainly isobutyl and isoamyl alcohols (Table 2). The behavior of these alcohols was like that observed in the first distillation. The heart fraction started with a concentration of higher alcohols of 450 mg/100 mL a.a. (Figure 2b) and finished with a value of 50 mg/100 mL a.a. This information indicates that the batch of artisanal Mezcal will be within limits allowed by the Official Mexican standard (100 and 500 mg/100 mL of a.a.). The tail fraction had a lower concentration of higher alcohols (around 50 mg/100 mL a.a.). In general, the behavior of higher alcohols in artisanal Mezcal was similar to those reported in sugarcane spirits (Alcarde *et al.*, 2011).

Some authors have demonstrated that higher alcohols are the largest group of aroma compounds in spirits (Spaho *et al.*, 2013; Anjos *et al.*, 2020).

Esters

Although NOM-070-SCFI-2016 does not regulate esters, they are required by the laws of other countries to which Mezcal is exported. In Mexico, Tequila must meet the permissible limits for esters (as ethyl acetate). The standard Mexican NMX-V-005-NORMEX-2013 establishes that esters should be considered as the sum of ethyl acetate and ethyl lactate. At the beginning of the distillation, they were present at high concentrations (Figure 2a). The first sample of ordinario had an esters content of 491.88 ± 5.81 mg/100 mL a.a. From the third sample (third liter of distillate), this concentration was reduced by approximately 70 %, reaching a concentration of 151.91 ± 15.83 mg/100 mL a.a. Esters' content decreased rapidly at the beginning of the distillation, which is attributed to the decrease in the ethyl acetate concentration. This metabolite was predominant (470 mg/100 mL a.a.) at the

Table 1. Concentration of volatile compounds during the first distillation of mezcal.

Tabla 1. Concentración de compuestos volátiles durante la primera destilación del mezcal.

Sample	Compound concentration (mg/100 mL a.a.)							
	Ethyl acetate	Ethyl lactate	2-Butanol	n-propanol	Isobutyl alcohol	n-Butanol	Isoamyl alcohol	Amyl alcohol
1	470 \pm 7.59 ^a	21.88 \pm 1.7 ^h	0.88 \pm 0.15 ^c	25.21 \pm 0.58 ^a	107.06 \pm 9.39 ^a	0.60 \pm 0.04 ^{ab}	440.80 \pm 49.56 ^a	1.26 \pm 0.32 ^d
3	124.09 \pm 16.10 ^b	27.82 \pm 0.28 ^{gh}	0.81 \pm 0.03 ^c	23.10 \pm 2.74 ^a	81.49 \pm 5.26 ^b	0.54 \pm 0.04 ^b	319.69 \pm 16.77 ^b	1.24 \pm 0.06 ^d
5	70.26 \pm 5.38 ^c	31.26 \pm 0.10 ^g	0.83 \pm 0.03 ^c	21.88 \pm 0.96 ^{ab}	66.73 \pm 1.65 ^c	0.54 \pm 0.01 ^b	258.49 \pm 4.68 ^c	1.28 \pm 0.03 ^d
7	64.95 \pm 0.73 ^c	33.03 \pm 3.88 ^g	0.88 \pm 0.05 ^c	22.12 \pm 0.21 ^{ab}	58.20 \pm 6.50 ^c	0.55 \pm 0.02 ^b	241.35 \pm 32.58 ^c	1.24 \pm 0.23 ^d
10	28.49 \pm 5.97 ^d	41.42 \pm 1.80 ^f	0.82 \pm 0.02 ^c	21.15 \pm 0.59 ^b	46.36 \pm 0.86 ^d	0.52 \pm 0.04 ^b	163.67 \pm 4.38 ^d	1.43 \pm 0.11 ^{cd}
12	20.47 \pm 1.73 ^d	48.50 \pm 1.20 ^e	0.89 \pm 0.10 ^{bc}	20.72 \pm 0.63 ^b	41.45 \pm 1.78 ^d	0.49 \pm 0.03 ^b	146.47 \pm 16.78 ^{de}	1.56 \pm 0.17 ^{cd}
15	31.79 \pm 19.58 ^d	54.93 \pm 4.47 ^d	0.98 \pm 0.04 ^{bc}	20.51 \pm 1.13 ^b	30.38 \pm 2.10 ^e	0.48 \pm 0.09 ^b	89.01 \pm 4.58 ^{ef}	1.56 \pm 0.26 ^{cd}
17	31.06 \pm 17.58 ^d	63.36 \pm 0.35 ^c	0.97 \pm 0.11 ^{bc}	22.43 \pm 1.98 ^{ab}	29.70 \pm 0.11 ^e	0.54 \pm 0.05 ^b	87.84 \pm 8.1 ^f	1.81 \pm 0.20 ^c
20	27.97 \pm 24.46 ^d	77.91 \pm 0.85 ^b	1.06 \pm 0.07 ^b	21.79 \pm 1.22 ^{ab}	28.24 \pm 0.61 ^e	0.57 \pm 0.04 ^{ab}	78.63 \pm 3.91 ^f	2.41 \pm 0.01 ^b
24	23.35 \pm 20.01 ^d	91.73 \pm 5.6 ^a	1.41 \pm 0.10 ^a	21.95 \pm 2.81 ^{ab}	25.70 \pm 3.00 ^e	0.77 \pm 0.25 ^a	63.14 \pm 6.34 ^f	3.28 \pm 0.43 ^a

Values of concentrations are given as the mean of two samples from two copper stills \pm standard deviation. Different superscript letters in the same column show significant differences according to the analysis of variance at $p \leq 0.05$ (Fisher LSD test).

beginning of the distillation (Table 1). Similar behavior of this ester has been reported in plum brandies, spirit from Spine grape (Spaho *et al.*, 2013; Balcerk *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2020). Its low boiling point (77°C) explains this and high solubility in ethanol (Léauté, 1990). On the other hand, esters' content decreased slowly in the middle and at the end of the first distillation (Figure 2a). Although the ethyl acetate concentration decreased (Fisher LSD test, $p \leq 0.05$), the ethyl lactate concentration increased (Table 1). The initial concentration of ethyl lactate was 21.88 ± 1.78 mg/100 mL a.a., which gradually increased to 91.73 ± 5.68 mg/100 mL a.a. The behavior of this metabolite is due to its high boiling point (154°C) and its solubility in water (Léauté, 1990).

In the second distillation, the head fraction was characterized by a high concentration of esters (1731.86 to 883.77 mg/100 mL a.a.), mainly ethyl acetate (Table 2). Esters were present in the heart fraction, ranging from 656.64 to 95.48 mg/100 mL a.a. The ethyl acetate concentration decreased while the ethyl lactate increased (Table 2). Thus, the tail fraction consisted mainly of ethyl lactate. This behavior is due to the high boiling point of ethyl lactate (154°C) and its solubility in water (Léauté, 1990).

Methanol

Methanol is generated during maguey cooking by the demethoxylation of the pectins present in the agave plants (Solís-García *et al.*, 2017). Immature maguey has been reported to have a higher pectin content than mature maguey

(Pinal *et al.*, 2009). Therefore, the use of mature maguey is recommended to decrease methanol generation.

Keep the methanol concentration within the permissible limits by Mexican standards is the main challenge for artisan producers. Many producers assume that the highest methanol concentrations are in the head fraction, only considering its low boiling point (64.7°C). In this study, methanol was present throughout the distillation process, and it shows an increase towards the end of the distillation process. Thus, its initial concentration was 138.22 ± 10.10 mg/100 mL a.a., this value increased constantly to 297.87 ± 32.65 mg/100 mL a.a. (Figure 3a). This behavior of methanol is due to solubility in water and its capacity to form hydrogen bonds with this molecule, which increases its molecular weight and decreases its volatility (Balcerk *et al.*, 2017).

In the second distillation, the methanol concentrations in the head and heart fractions were lower than those in the tail fraction (Figure 3b). The main fraction, the heart, had an initial methanol concentration of 148.71 mg/100 mL a.a., increasing progressively in each sample collected, reaching a concentration of 238.08 mg/100 mL a.a. in the last sample (Figure 3b). This compound occurred in concentrations lower than the limits specified by Mexican regulations in this fraction of distillate. Tail fraction was characterized by high methanol concentrations (239.11 to 362.16 mg/100 mL a.a. Figure 3b). This behavior of methanol was associated with the phenomenon described above.

Table 2. Concentration of volatile compounds during the second distillation of artisanal mezcal.

Tabla 2. Concentración de compuestos volátiles durante la segunda destilación del mezcal artesanal.

Sample	Distillate fraction	Compound concentration (mg/100 mL a.a.)							
		Ethyl acetate	Ethyl lactate	2-Butanol	n-Propanol	Isobutyl alcohol	n-Butanol	Isoamyl alcohol	Amyl alcohol
1		1726.82	5.04	1.39	25.95	99.78	0.22	293.23	0.64
7	Head	999.67	7.98	1.57	26.00	93.96	0.46	296.48	0.69
9		874.95	8.82	1.63	29.27	105.16	0.54	335.88	0.94
14		471.92	9.61	0.97	27.89	103.9	0.53	338.79	0.74
21		162.53	9.66	0.88	24.89	88.13	0.49	309.64	0.77
30		105.65	10.48	0.98	25.29	82.66	0.51	308.20	0.81
40		38.45	12.21	1.03	24.15	67.72	0.41	280.75	0.65
50	Heart	19.18	15.26	0.92	23.13	54.40	0.43	234.30	0.74
58		18.27	22.00	0.89	26.59	51.68	0.50	240.59	0.88
60		13.45	17.79	0.56	22.60	42.92	0.35	187.71	0.75
70		16.30	28.94	0.51	21.94	32.64	0.37	144.63	0.81
80		19.56	35.79	0.54	19.74	33.96	0.35	123.97	1.02
87		26.38	47.79	0.58	17.54	13.48	0.25	48.21	1.28
98		27.39	75.21	0.50	13.00	9.40	0.29	15.32	1.78
104	Tail	33.94	101.28	0.52	16.90	9.79	0.65	20.48	2.30
109		44.85	128.88	0.60	17.95	9.53	0.97	29.89	2.37

The concentration values correspond to a single measurement of the samples collected from the distillate of the second distillation.

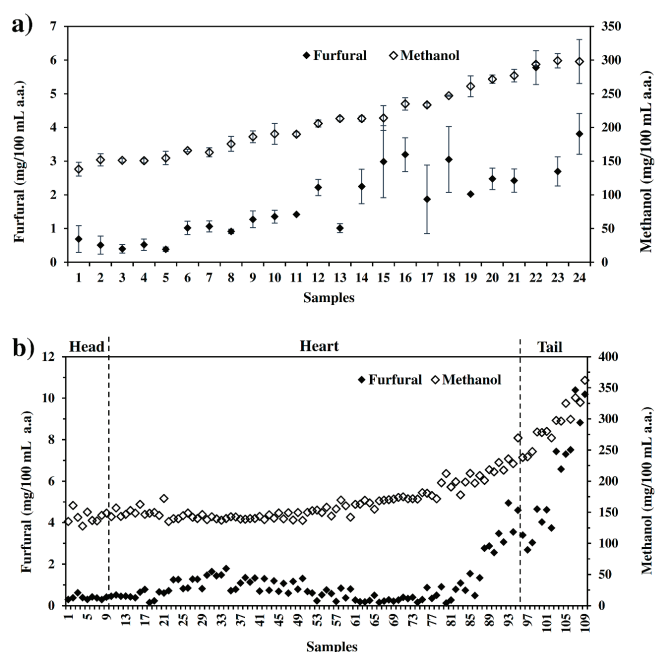


Figure 3. Behavior of methanol and furfural during the first (a) and second (b) distillation of artisanal Mezcal. The vertical dotted lines on figure "b" indicate the distillate cuts. In figure "a", concentration values are given as the mean of the samples from two copper stills \pm standard deviation.

Figura 3. Comportamiento del metanol y furfural durante la primera (a) y segunda (b) destilación del Mezcal artesanal. Las líneas punteadas verticales en la figura "b" indican los cortes del destilado. En la figura "a", los valores de las concentraciones se dan como la media de las muestras de dos alambiques de cobre \pm desviación estándar.

Furfural

The hydrolysis of fructans by heat treatments also leads to the generation of furans such as 5-(hydroxymethyl) furfural, furfural, and others (García-Soto *et al.*, 2011). These compounds are formed by the degradation of reducing sugars (García-Soto *et al.*, 2011) and the Maillard reaction (Mancilla-Margalli and López, 2002). Also, furfural synthesis occurs in the heated pot (Balcerak *et al.*, 2017), mainly during the first distillation (Awad *et al.*, 2017).

The 5-HMF plays an essential role in the flavor of the Mezcal; this contributes to the characteristic aroma of cooked maguey. However, this compound and furfural hurt the yield of ethanol production; it affects yeast metabolism (consumption of sugars) (García-Soto *et al.*, 2011). The NOM-070-SCFI-2016 establishes a maximum permissible limit of furfural of 5 mg/100 mL a.a.

At the beginning of the distillation, the distillate had a furfural concentration of 0.69 ± 0.39 mg/100 mL a.a. (Figure 3a). However, during the middle and end of the first distillation, an increase in furfural concentration was observed, reaching values of 3.81 ± 0.61 mg/100 mL a.a. for the last sample (Figure 3a). That is, when the ethanol concentration decreased, the furfural concentration increased, since furfural is very soluble in water and has a high boiling point (Zhao *et al.*, 2014); therefore, this furan is predominant in the tail fraction.

In the second distillation, furfural started with a concentration of 0.3 mg/100 mL a.a. This concentration remained constant in the head fraction. Then, its concentration increased from 0.41 to 3 mg/100 mL a.a. approximately in the heart fraction. Finally, while in the tails, it reached concentrations between 3 and 10 mg/100 mL a.a. This data reveals the importance of accurate cuts of the distillate fractions. In this case, if more volume of the tail fraction is collected as part of the heart fraction, the concentration of furfural would increase, and it could even exceed the permissible limit.

According to the results of the present study and the distillation conditions employed, such as the use of butane gas, 300 L copper stills, as well as the maguey species (*A. angustifolia*), it is possible to suggest the distillation cuts during the rectification process as follows: the distillation cut of the head fraction could be performed when the distillate stream has a high ethanol concentration (around 75% v/v); then, the distillation cut of the heart fraction from the tail fraction could be performed when the ethanol concentration in the stream is around 20-30% (v/v); finally, the distillation cut of the tail fraction can be performed at a lower alcohol content (12-14% (v/v) ethanol).

To have greater precision in the distillation cuts, it is recommended to consider the maguey species and maturity stage (Pinal *et al.*, 2009), total reducing sugar content, long or short shaving of the stem leaves, environmental temperature, natural fermentation, and region of production, as factors that influence on the synthesis of volatile compounds (Kirchmayr *et al.*, 2017; Nolasco-Cancino *et al.*, 2019; Ruiz-Terán *et al.*, 2019). Also, it is important to draw the distillation curve of each maguey species used in the mezcal production

Although the absolute concentrations of these compounds vary, their behavior and relationship with the ethanol concentration will be the same. That is, when the ethanol concentration in the distillate stream is high (75-77% v/v), higher alcohols, aldehydes, and esters are abundant. Therefore, when there are problems with compliance with the maximum permissible limits of these compounds, the cut of the head fraction will have to be increased (Figure 2b).

On the contrary, methanol and furfural are compounds that predominate when the ethanol concentration in the distillate stream is low ($\leq 20\%$ v/v). Therefore, when there are problems with compliance with the maximum permissible limit of methanol (300 mg/100 mL a.a.) or furfural (5 mg/100 mL a.a.), the cut of the heart fraction from the tail fraction will have to be reduced; that is, this fraction should be separated when the distillate stream has an ethanol concentration $>20\%$ (v/v) (Figure 3b).

CONCLUSION

The volatile compounds showed different concentrations among the head, heart, and tail fractions. Esters, higher alcohols, and aldehydes were predominant in the head fraction. While in the tail fraction, methanol and furfural were principal. This study revealed the importance of knowing the

behavior of the regulated chemical compounds to establish suitable cuts of the distillate. Results suggest that the measurement of ethanol concentration during the distillation process can be helpful to define the distillation cuts adequately and improve the chemical and organoleptic qualities, and the Maestros mezcaleros can certify their Mezcal.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the distillery “Los danzantes” for allowing us to collect the distillate samples during the artisanal distillation process.

REFERENCES

- Alcarde, A. R., Souza, P. A. de, and Belluco, A. E. de S. 2011. Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 31(2): 355-360.
- Anjos, O., Santos, R., Estevinho, L. M., and Caldeira, I. 2020. FT-RAMAN methodology for the monitoring of honeys' spirit distillation process. *Food Chemistry*. 305:125511.
- Awad, P., Athès, V., Decloux, M. E., Ferrari, G., Snackers, G., Raguenaud, P., and Giampaoli, P. 2017. Evolution of Volatile Compounds during the Distillation of Cognac Spirit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(35): 7736-7748.
- Balcerek, M., Pielech-Przybylska, K., Patelski, P., Dziekońska-Kubczak, U., and Strąk, E. 2017. The effect of distillation conditions and alcohol content in 'heart' fractions on the concentration of aroma volatiles and undesirable compounds in plum brandies. *Journal of the Institute of Brewing*. 123(3): 452-463.
- Cai, X., Shen, Y., Chen, M., Zhong, M., Zhou, Y., and Luo, A. 2019. Characterization of volatile compounds in Maotai flavour liquor during fermentation and distillation. *Journal of the Institute of Brewing*. 125(4): 453-463.
- García-Soto, M. J., Jiménez-Islas, H., Navarrete-Bolaños, J. L., Rico-Martínez, R., Miranda-López, R., and Botello-Álvarez, J. E. 2011. Kinetic study of the thermal hydrolysis of *Agave salmiana* for mezcal production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(13): 7333-7340.
- Jackowetz, J. N., Dierschke, S., and Mira de Orduña, R. 2011. Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*. 44(1): 310-316.
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., and Gschaedler Mathis, A. 2017. Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT - Food Science and Technology*. 79: 160-169.
- Leal-Granadillo, I. A., Miquilena-Gómez, R., and Morán-Guillén, H. 2007. Evaluación del proceso de destilación del cocuy de pecaya a partir de la composición de los volátiles mayoritarios. *Multiciencias*. 7(2): 181-189.
- Léauté, R. 1990. Distillation in alambic. *American Journal of Enology and Viticulture*. 41(1): 90-103.
- Loviso, C. L., and Libkind, D. 2019. Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols. *Revista Argentina de Microbiología*. 51(4): 386-397.
- Mancilla-Margalli, N. A., and López, M. G. 2002. Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(4): 806-812.
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J. A., Wachter, C., and Ruíz-Terán, F. 2018. Predominant yeasts during artisanal mezcal fermentation and their capacity to ferment maguey juice. *Frontiers in Microbiology*. 9: 2900.
- Norma Mexicana NMX-V-005-NORMEX-2013, Bebidas alcohólicas-Determinación de aldehídos, ésteres, metanol y alcoholes superiores-Métodos de ensayo. 2013. Diario Oficial de la Federación.
- Norma Mexicana NMX-V-013-NORMEX-2013. Bebidas alcohólicas-Determinación del contenido alcohólico (por ciento de alcohol en volumen a 293 K) (20°C) (% Alc. Vol.)-Métodos de ensayo. 2013. Diario Oficial de la Federación.
- Norma Mexicana NMX-V-004-NORMEX-2013. Bebidas Alcohólicas- Determinación de furfural-Métodos de Ensayo. 2013. Diario Oficial de la Federación.
- Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. [accessed July 2, 2021] 2016. Available in: http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6437/seeco11_C/seeco11_C.html
- Pinal, L., Cornejo, E., Arellano, M., Herrera, E., Nuñez, L., Arrizon, J., and Gschaedler, A. 2009. Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36(5): 655-661.
- Prado-Ramírez, R., Gonzáles-Alvarez, V., Pelayo-Ortiz, C., Casillas, N., Estarrón, M., and Gómez-Hernández, H. E. 2005. The role of distillation on the quality of tequila. *International Journal of Food Science and Technology*. 40: 701-708.
- Rage, G., Atasi, O., Wilhelmus, M. M., Hernández-Sánchez, J. F., Haut, B., Scheid, B., Legendre, D., and Zenit, R. 2020. Bubbles determine the amount of alcohol in Mezcal. *Scientific Reports*. 10(1): 1-16.
- Ruiz-Terán, F., Martínez-Zepeda, P. N., Geyer-de la Merced, S. Y., Nolasco-Cancino, H., and Santiago-Urbina, J. A. 2019. Mezcal: indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and their potential as starter cultures. *Food Science and Biotechnology*. 28(2): 459-467.
- Solís-García, A., Rivas-García, P., Escamilla-Alvarado, C., Rico-Martínez, R., Bravo-Sánchez, M. G., and Botello-Álvarez, J.E. 2017. Methanol production kinetics during agave cooking for mezcal industry. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 16(3): 827-834.
- Spaho, N., Đukic-Ratković, D., Nikićević, N., Blesić, M., Tešević, V., Mijatović, B., and Smajić Murtić, M. 2019. Aroma compounds in barrel aged apple distillates from two different distillation techniques. *Journal of the Institute of Brewing*. 125(3): 389-397.
- Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., López, M., and Chávez-Servia, J. 2018. Volatile compound profiles in mezcal spirits as influenced by *Agave* Species and production processes. *Beverages*. 4(1): 9.
- Xiang, X. F., Lan, Y. Bin, Gao, X. T., Xie, H., An, Z. Y., Lv, Z. H., Yin-Shi, Duan, C. Q., and Wu, G. F. 2020. Characterization of odor-active compounds in the head, heart, and tail fractions of freshly distilled spirit from Spine grape (*Vitis davidii* Foex) wine by gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Research International*. 137:109388.
- Zhao, Y., Tian, T., Li, J., Zhang, B., Yu, Y., Wang, Y., and Niu, H. 2014. Variations in main flavor compounds of freshly distilled brandy during the second distillation. *International Journal of Food Engineering*. 10(4): 809-820.

Physicochemical study of chitin and chitosan obtained from California brown shrimp (*Farfantepenaeus californiensis*) exoskeleton

Estudio Físicoquímico de Quitina y Quitosana obtenidas a partir del exoesqueleto de camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*)

Martínez-Robinson K¹, Martínez-Inzunza A², Rochín-Wong S², Rodríguez-Córdova RJ², Vásquez-García SR³, Fernández-Quiroz D^{2*}

¹ Grupo de Investigación en Biopolímeros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Hermosillo 83304, Sonora, México.

² Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia. Universidad de Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, México.

³ Departamento de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Morelia 58030, Michoacan, México.

ABSTRACT

This work describes the physicochemical study of chitin and chitosan isolated from the brown shrimp exoskeleton (*Farfantepenaeus californiensis*), which is collected from the Gulf of California. A consecutive treatment carried out the chitin isolation process, including demineralization and deproteinization. On the other hand, the preparation of chitosan was through alkaline hydrolysis, and the product purified by using membrane filter series to homogenize the macromolecular chains size. According to the methodology, the chitin and chitosan yield was around 33 % and 23 % (dry weight), respectively. The materials characterization was by FTIR spectroscopy and thermogravimetric analysis. In addition, the analysis of chitosan samples were by proximal test, viscometric-average molecular weight, and deacetylation degree. The products exhibited chemical structure and physicochemical properties comparable to biopolymers isolated from similar sources reported in the literature. Chitosan showed a 15.87 % degree of acetylation (by ¹H-NMR analysis) and a $M_v = 170$ kDa. The results show the chitinous waste from the Sea of Cortez coast, as a promising chitosan source for several applications in the region.

Keywords: biopolymers, crustacean waste, isolation of chitin, viscosity-average molecular weight, degree of acetylation.

RESUMEN

Este trabajo describe el aislamiento de quitina y optimización del proceso de desacetilación para obtener quitosana a partir del exoesqueleto de camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*), recolectado del Golfo de California. La extracción de quitina se realizó a través de un proceso consecutivo de desmineralización y desproteinización. Por otro lado, la desacetilación se llevó a cabo por hidrólisis alcalina, y el producto se purificó utilizando una serie de filtros de membrana para homogeneizar el tamaño de las cadenas macromoleculares. De acuerdo con la metodología seguida, se obtuvo rendimiento del 33 % y 23 % (base seca) de quitina y quitosana, respectivamente. Los materiales se caracterizaron por espectroscopía FTIR y análisis termogravimétrico. Asimismo, se evaluó el análisis proximal, peso molecular

viscosimétrico y el grado de acetilación en la muestra de quitosana. Los productos obtenidos presentaron estructura química y propiedades físicoquímicas comparables con los biopolímeros aislados por métodos similares reportados en la literatura. Se encontró que la quitosana pura tiene un grado de acetilación de 15.87 % (estimado por ¹H-RMN) y $M_v = 170$ kDa. Los resultados obtenidos sugieren que los desechos quitinosos del Mar de Cortés pueden considerarse como una fuente importante para la preparación de quitosana y utilizarse para diversas aplicaciones de la región.

Palabras clave: biopolímeros, residuo de crustáceo, aislamiento de quitina, peso molecular viscosimétrico promedio, grado de acetilación.

INTRODUCTION

Biopolymers from natural resources are considered an exciting alternative for the developing functional materials in emergent areas of human activity (Do Nascimento Marques *et al.*, 2020). In this context, chitin is one of the most abundant polysaccharides in the biosphere. It is synthesized by many living organisms, mainly arthropods, mollusks, and the fungi kingdom (Peniche *et al.*, 2008). Chitin naturally occurs in the endocuticle of the crustacean exoskeleton matrix, which is closely associated with proteins, pigments, and inorganic salts (Figure 1) (Pastor de Abram, 2004). Chemically, chitin is constituted by β -(1 \rightarrow 4) glycosidic binding units of *N*-acetyl-D-glucosamine (Figure 2). This polysaccharide has exhibited interesting properties, such as antimicrobial activity, biodegradability, low immunogenicity, high insolubility, and low chemical reactivity (Ravi Kumar, 2000). Furthermore, a substantial amount of the produced chitin is deacetylated to obtain chitosan, thus improving its properties expanding its derivatization ability and applications.

Chitosan (Cs) is a random copolymer constituted by β -(1 \rightarrow 4) linked units of *N*-acetyl-D-glucosamine (acetylated units) and D-glucosamine (deacetylated units) (Figure 2). Commonly, this biopolymer is obtained by deacetylation of chitin, although it has also been found naturally in the cell wall of some fungal groups such as *Zygomycetes* (Ghormade *et al.*, 2017). The investigation of chitosan in

*Autor para correspondencia: Daniel Fernández Quiroz
 Correo electrónico: daniel.fernandez@unison.mx

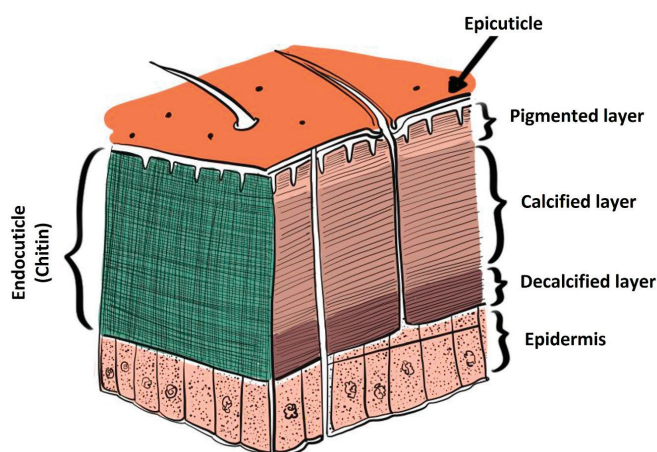


Figure 1. Scheme of the crustacean matrix microstructure, constituted by the epicuticle, the endocuticle, and the epidermis, with chitin localized into the endocuticle. Reprinting from Ref. Pastor de Abram (2004), Copyright 2004, with permission from Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Figura 1. Esquema para la microestructura de la matriz de los crustáceos, la cual está constituida por la epicutícula, endocutícula y la epidermis. La quitina se encuentra en la endocutícula. Reimpreso de Pastor de Abram (2004), Copyright 2004, con permiso del Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

fields as biotechnology, biomedicine, and food industry has prominently heightened, owing to their properties like biocompatibility, mucoadhesivity, non-toxicity, among others (Argüelles-Monal *et al.*, 2018).

Traditionally, the large-scale production of chitin and chitosan is mainly from crustacean waste of the seafood industry (Dahmane *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2021; Younes and Rinaudo, 2015). The isolation procedures include chemical and biological methods and other emerging approaches such as microwave-based (EL Knidri *et al.*, 2019) and ultrasound-based (Hou *et al.*, 2020) methods. In this respect, the chemical method is a scalable and well-established protocol that involves the lixiviation of minerals, proteins, and pigments from the exoskeleton matrix (Joseph *et al.*, 2021; Peniche *et al.*, 2008; Younes and Rinaudo, 2015).

Various reports on chemical approaches to produce chitin and chitosan are available; however, no standard method is still established. Thus, the treatment must be tailored to the particular source of chitin, owing to their ultra-

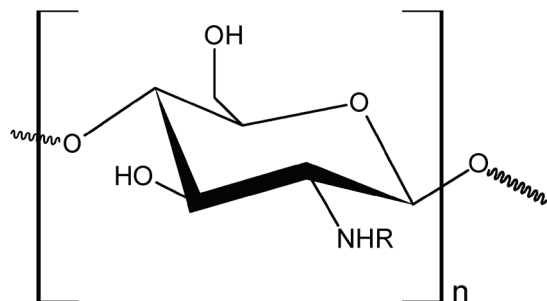


Figure 2. Molecular structure for chitin ($R = -COCH_3$) and chitosan ($R = -H$).
Figura 2. Estructura molecular para la quitina ($R = -COCH_3$) y la quitosana ($R = -H$).

structure being strongly dependent on the species (Younes and Rinaudo, 2015). Consequently, selecting an appropriate treatment has a notable influence on the quality and physicochemical properties of the final product. The source-based substantial differences comprise the polymer chain length, the acetylation degree, and the distribution of the N-acetylated groups along the macromolecular chain (Joseph *et al.*, 2021). Undoubtedly, understanding the chemical structure of these biopolymers is essential for estimating their functional properties and potential applications (Younes and Rinaudo, 2015). In recent decades, several investigations about the chemical obtaining and characterization of these polymers from different sources are reported (Dahmane *et al.*, 2014; EL Knidri *et al.*, 2019; Mohammed *et al.*, 2013; Puvvada *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

In this sense, the penaeid shrimp are a class of crustaceans with commercial importance in tropical and subtropical seas, reaching 1 Mt/yr of world catch (Rábago-Quiroz *et al.*, 2019). The shrimp fishery represents one of the leading industries in Mexico, owing to the social and economic benefits involved. Precisely, the Pacific coast in the Gulf of California (Sonora and Sinaloa, Mexico) provides over 77% of the global shrimp production in Mexico (CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca), 2018). The three main commercial species in this region are the blue shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson, 1871), white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), and the brown shrimp *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1990; Rábago-Quiroz *et al.*, 2019). The latter constitutes the most abundant species in the fishery by weight of the offshore catch (Meraz-Sánchez *et al.*, 2013), whereby the exoskeleton waste represents a by-product of the seafood industry that could be a potential resource for chitin and chitosan. Despite the importance of this topic, to the best of our knowledge, there are no previous reports about physicochemical studies of the chitin and chitosan produced from this particular genus.

In this context, this work aims to develop a protocol to obtain chitin and chitosan from the exoskeleton of brown shrimp (*Farfantepenaeus californiensis*). This study also emphasized evaluating the fundamental physicochemical properties to understand the structure-function relationship of the chitosan obtained.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The solvents and reagents used were analytical grade and acquired from FAGALAB (Mocorito, Sinaloa, Mexico). Unless otherwise stated, all experiments were carried out using Type 2 pure water (conductivity $< 0.2 \mu\text{s cm}^{-1}$).

Preparation of the chitinous waste

A local seafood restaurant from Guaymas, Sonora, Mexico donated the raw shrimp shells at the beginning of the catch season (September-October) to guarantee the size of the crustacean as homogeneous as possible. The fishers of

the Sea of Cortez coast directly provided the single species shrimp *Farfantepenaeus californiensis* to the establishment. The brown shrimp is the predominant species in bays and offshore of the Gulf of California region, which has distinctive and easily identifiable morphological characteristics (size, shape, and shell color) from other endemic species (Barbosa-Saldaña *et al.*, 2012).

The fresh material was vigorously washed against tap water to eliminate the organic waste; later, the sample was stored at -20 °C until before processing (overnight), and finally, the frozen sample ground to homogenize using a conventional food processor (150 W).

Demineralization

Chitin isolation was according to the procedure reported by Beaney *et al.* (2005) with slight modifications. Briefly, the triturated residue was integrated with an HCl aqueous solution (1.8 M), with continual stirring at room temperature for 2 h, and the material washed against tap water to neutralize.

Deproteinization

The demineralized material was mixed with NaOH aqueous solution (15 wt%) using a 1:15 residue/solvent ratio; the mixture remained with continual stirring at 65 °C for 2 h, then the material washed against tap water to neutralize. Finally, the product was dispersed in a flat container and dried at 60 °C for 24 h.

Obtention of chitosan

The chitin deacetylation to produce chitosan was carried out by chemical method. To this end, the chitinous material was treated with a 50 wt% NaOH aqueous solution at 100 °C, under continual stirring for 2 h, then washed against tap water until neutral pH and finally dried in a conventional oven (IGS400 *Heratherm*, *Thermo Scientific*) at 60 °C for 24 h.

An exhaustive process of filtration achieved the chitosan purification. To this purpose, the sample dissolved in 0.3 M acetic acid aqueous (0.35 w/v %) was successively filtered through cellulose filter paper (particle retention ≥ 11 μm , Whatman®) and nitrocellulose membranes (pore size: 3 μm , 1.2 mm, 0.8 mm y 0.45 mm, *MF-millipore™*). Subsequently, it was precipitated by dropwise addition of 0.3 M ammonium hydroxide until pH~8. The precipitated material, carefully washed with water until no change in conductivity detected, was separated using a centrifuge (*Thermo Scientific*, *Heraeus Megafuge 16*). Finally, the product was freeze-dried (2.5L Benchtop Freeze Dryers, Labconco corporation) and stored at room temperature.

Proximal analysis

The quantification of protein content in the chitin and chitosan samples was according to the method proposed by Díaz-Rojas *et al.* (2006). This approach allows estimating protein and chitin from the total nitrogen content, knowing

the composition of the other components in the sample. To this end, the total nitrogen content of the polymer samples was determined by the micro *Kjeldahl* method, and the official analytical methods used to estimate moisture (Method 991.01), minerals (Method 942.05), and lipids (Method 7.06) (Association of Official Analytical Chemists, 1990).

Briefly, the moisture content of the raw material and the chitosan sample was determined by heating in a conventional oven (IGS400 *Heratherm*, *Thermo Scientific*) at 100 °C for 24 h. The calculation of water content was by comparing the weight of the sample before and after the drying process. The estimation of the ash content was by the gravimetric method using calcination in a conventional oven at 800 °C to obtain the ash (4 h), and then the sample kept in a desiccator for 24 h to obtain constant weight. The following equation calculated the ash content percentage:

$$\text{Ash (\%)} = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

Where m_0 is the mass of the dry sample (before the calcination process), and m_1 corresponds to the mass of the calcinated product, these procedures were carried out in triplicate.

ATR-FTIR spectroscopy

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were analyzed using Thermo Scientific Nicolet iS-50 equipment (Madison, WI, USA). Samples were performed in attenuated total reflectance mode for 64 scans, using a resolution of 4 cm^{-1} .

The estimation of the degree of acetylation (DA) in the chitosan sample was through infrared spectral analysis. To this purpose, the characteristic band located at 1320 cm^{-1} (amide III) was chosen to measure the DA, and the band at 1420 cm^{-1} (-OH group) was used as an internal reference, according to the correlation proposed by (Brugnerotto *et al.*, (2001)

$$\text{DA (\%)} = \left[31.92 \times \left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) \right] - 12.20 \quad (2)$$

Where A_{1320} and A_{1420} correspond to the absorbance of the bands localized at 1320 y 1420 cm^{-1} , respectively.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR)

Recording of the high-resolution ¹H-NMR spectroscopy data was on a Bruker Avance 400 equipment (400 MHz), analyzing the chitosan sample dissolved in D₂O/DCI (8 mg mL⁻¹) at 20 °C with *MestreNova* software (Santiago de Compostela). The proton chemical shift of residual water was chosen as a reference.

The degree of *N*-acetylation of the chitosan sample was determinate by ¹H-NMR analysis. The measurement was carried out from the ratio between the signal of the C-H proton (3.10 ppm) of the *N*-D-glucosamine monomeric unit and the signal of the three *N*-acetyl protons (2.00 ppm) relative to the *N*-acetyl-D-glucosamine monomeric unit (Vårum *et al.*,

1991). Then, the calculation of the DA percentage was by the following equation.

$$DA (\%) = \left(\frac{I_{2.0 \text{ ppm}}}{I_{5.10 \text{ ppm}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Viscosity-average molecular weight (M_v)

The kinematic viscosity measurements were performed with an Ubbelohde capillary viscometer (diameter 0.58 mm) at 25 °C by quadruplicate. To this end, the chitosan sample was previously dissolved in the solvent 0.3 M AA + 0.2 M sodium acetate (1 mg mL⁻¹) (Rinaudo *et al.*, 1993). Then, the calculation of the viscosity-average molecular weight of pure chitosan was by the *Mark-Houwink-Sakurada* equation:

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (4)$$

Where $[\eta]$ is the intrinsic viscosity; K and α are the empirical constants on the polymeric system, the solvent system, and the temperature used. To the solvent system used, the *Mark-Houwink* parameters as K= 0.076 mL g⁻¹, and α = 0.76 (Rinaudo *et al.*, 1993).

Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed in TGA Pyris equipment (Perkin Elmer). The recording of samples were in palladium pans in a range of 25 °C to 600 °C at 10 °C min⁻¹, under nitrogen flow (10 mL min⁻¹). The analysis of the results were with the TA Universal Analysis software.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of chitin

Figure 3 displays the procedure for the isolation of chitin and the preparation of chitosan. The treatment involves the reduction and homogenization of the particle size of the raw material (< 20 mm). This step is crucial to increase the sample's surface area and favors the subsequent lixiviation process of the proteins, minerals, and pigments (associated with the matrix of the crustacean exoskeleton).

Demineralization decomposes the minerals in water-soluble inorganic salts (mainly calcium carbonates and phosphates). On the other hand, deproteinization involves disrupting chemical interactions into the chitin-proteins complex, which represents a more significant challenge to separate the undesirable substances (Younes and Rinaudo, 2015). Both treatments require rigorous washing of the product to eliminate as much residue as possible. In some investigations, the design of an inverted sequence for the waste removal process has been reported (Sierra *et al.*, 2013), however, it is often recommended for chitin extraction from high protein raw materials (e.g., shrimp heads) (Beaney *et al.*, 2005; Pastor de Abram, 2004).

The process conditions and the solvents used resulted appropriated to achieve chitin isolation, obtaining 33 % (dry mass) of yield by gravimetry. Previous work reports that the yield of chitin is strongly dependent on the biological origin of the raw material and the processing (Kurita, 2006). In this regard, Kurita *et al.* (Sannan *et al.*, 1976) documented that the

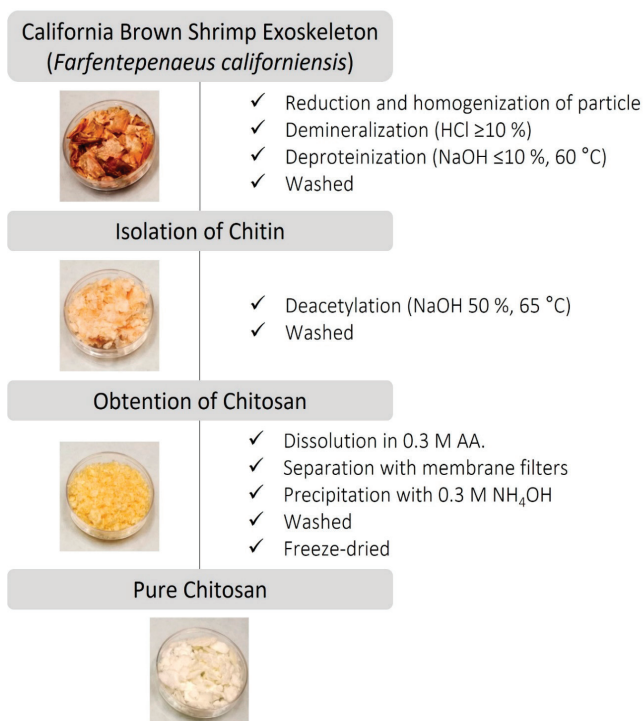


Figure 3. Procedure for chitin and chitosan obtention from California brown shrimp (*Farfantepenaeus californiensis*) exoskeleton. Illustrations display the morphological appearance of the exoskeleton, chitin, chitosan, and pure chitosan.

Figure 3. Procedimiento para la obtención de quitina y quitosana a partir del exoesqueleto de camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*). Las ilustraciones internas muestran la apariencia morfológica del exoesqueleto, quitina, quitosana y quitosana pura.

chitin content in the dried shrimp exoskeleton is closed to 30-35 %. Using a chemical protocol, Percot *et al.* (2003) obtained 20 % chitin from the *Parapenaeopsis stylifera* shrimp species exoskeleton; Abdou *et al.* (2008) isolated chitin from *Penaeus aztecus* and *Penaeus durarum* shrimp species and achieved 21.53 % y 23.72 %, respectively. In another study, Puvvada *et al.* (2012) report that 34 % of chitin yield was obtained from *Penaeus carinatus* and *Penaeus monodon* shrimp exoskeleton, in the Suryalanka Coast (Guntur, India). On the other hand, Rødde *et al.* (2008) performed a systematic study about the dependence of the chitin properties on the seasonal variation, using shrimp shells of the deep-water *Pandalus borealis* species; in this work, the chitin content from the shrimp waste was found between 17-20 % (dry weight), and no apparent seasonal differences were found. Accordingly, a comparative analysis suggests that the *Farfantepenaeus californiensis* brown shrimp species constitutes an economically feasible resource for the industrial-scale production of chitin.

The appearance of the raw material and the obtained products were compared visually. The evolution of the depigmentation and texture after each sample treatment is displayed in the illustrations of Figure 3. The dry sample of chitin had a pale pink-orange tone and flake-like shape. This coloration is typical of crustacean species' inherent pigments and proteins. Basically, the pigments comprise carotenoids such as astaxanthin, lutein, canthaxanthin, β -carotene (Tana-

ka *et al.*, 1976), representing an exciting by-product for the chitin and chitosan production industry. In some cases, a supplementary decolorization treatment after the demineralization/deproteinization process results in the removal of these pigments.

Preparation of chitosan

The chitin obtained was partially deacetylated via chemical treatment to produce chitosan. In this work, the deacetylation process was performed under concentrate alkaline conditions, accompanied by harsh thermal treatment. Some factors that influence the stringency of the process are: (i) the limited reactivity of acetamide groups (trans configuration); (ii) the occurrence of secondary hydrogen bonds between the carbonyl group and the amide group of the side chains; and (iii) the packing density that characterizes the crystal structure of chitin (Pastor de Abram, 2004).

On the other hand, the purification of the sample favors the elimination of residual substances emanating from the deacetylation reaction and homogenizes the product. Considering the dry mass of the exoskeleton, the yield of chitosan production was 23 %. This data is lower than the results obtained by other authors (Puvvada *et al.*, 2012), which may be attributable to the sumptuous separation process involved. The freeze-dried chitosan showed an off-white with a slightly tan color and porous-like structure due to the natural drying process (Figure 3). The decolorization is typical of the deacetylation reaction since it involves removing or degrading a considerable amount of the inherent residual pigments of the raw material. In this sense, Beaney *et al.* (2005) performed a comparative study of two treatments (lactic acid fermentation and chemical method) to extract chitin from *Nephrops norvegicus* prawn shell; these authors report that the severe chemical treatment promotes the removal or degradation of most of the inherent pigments.

On the other hand, the proximal analysis showed that the chitosan sample had 10.41 ± 0.032 % moisture content, 0.11 ± 0.042 % ash, and 12.65 ± 0.948 % proteins. These results agree with those reported for products obtained from similar raw materials (Beaney *et al.*, 2005; Sierra *et al.*, 2013).

Spectroscopy characterization

FTIR and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy elucidated the chemical identity of the samples. The FTIR spectra for the exoskeleton, chitin, and pure chitosan are shown in Figure 4. The unpurified chitosan sample displayed similar spectrum patterns with the purified samples (data not shown). Altogether, the chitin spectrum exhibits sharpened absorption bands than the chitosan sample. These results can be attributed to the high crystallinity of the chitin sample compared with its deacetylated derivative (Rinaudo, 2006).

The chitin spectrum displays sharp bands at 3434 cm^{-1} (O-H group stretching vibration, intermolecular hydrogen interactions) and 3254 cm^{-1} (N-H vibration). The accurate position of the O-H vibration band is dependent on the hydrogen bond strength. The sharpness of these bands can

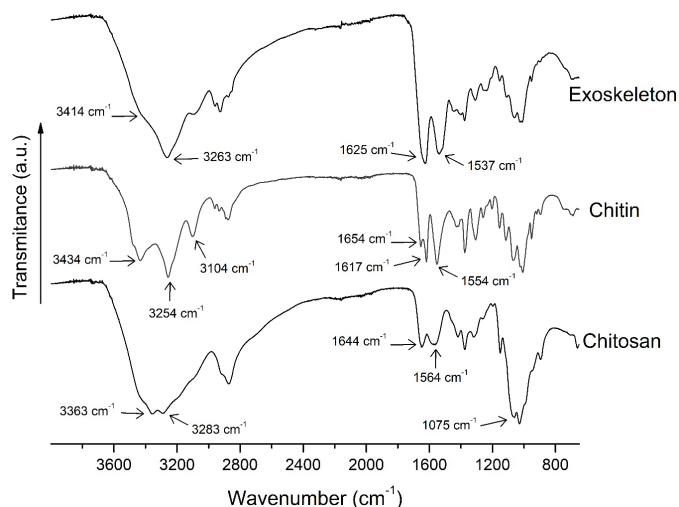


Figure 4. FTIR spectra for the exoskeleton, chitin, and pure chitosan.
Figure 4. Espectros FTIR para el exoesqueleto, quitina, quitosana.

be attributed to the concentration and ordered molecular conformation of the polysaccharide chains (Socrates, 2001). Likewise, the exoskeleton spectrum shows these bands; the absorption of O-H vibration appears as a shoulder at 3407 cm^{-1} due to the superimposition with the broad N-H band (Socrates, 2001); the overlap of this band may be due to the presence of substances associated with the exoskeleton matrix. In the chitosan spectrum, those bands appear as a shift to lower wavenumbers (3363 cm^{-1}), which could be assigned to the presence of additional intramolecular hydrogen bonds (Socrates, 2001). Similar results were reported by Palpandi *et al.* (2009) for chitin and chitosan prepared from the *Nerita crepidularia* mangrove gastropod exoskeleton and operculum.

The amide I band appears to split into two signals in the chitin spectrum at 1654 and 1617 cm^{-1} . According to Rinaudo (2006), the occurrence of this double band is typical for the α -chitin allomorph in the crystalline structure. The α -chitin form is characterized by the strong adhesion between the sheets of the chitin crystalline structure due to the hydrogen bonds (Argüelles *et al.*, 2004). This result suggests that the chitin isolated from California brown shrimp has mostly this allomorph. Likewise, the amide II band is observed at 1554 cm^{-1} . On the other hand, the chitosan spectrum shows typical strong bands at 1644 cm^{-1} (amide I, C=O group stretching vibration), at 1564 cm^{-1} (amide II, N-H bending motion), and, at 1075 and 1028 cm^{-1} due to skeletal vibration of the pyranose ring (Pastor de Abram, 2004).

High-resolution $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy was carried out to ascertain the molecular structure of the chitosan sample (Figure 5). The spectrum exhibits chemical shifts for the corresponding protons to *N*-acetyl-glucosamine molecular unit at 2.00 ppm (H-acetyl) and 4.51 ppm (H-1). Furthermore, the resonance attributed to *N*-glucosamine residue was observed at 3.10 ppm (H-2), and the peaks corresponding to the H-2/H-6 protons were localized between 3.5 and 3.83 ppm (Rinaudo, 2006; Vårum *et al.*, 1991).

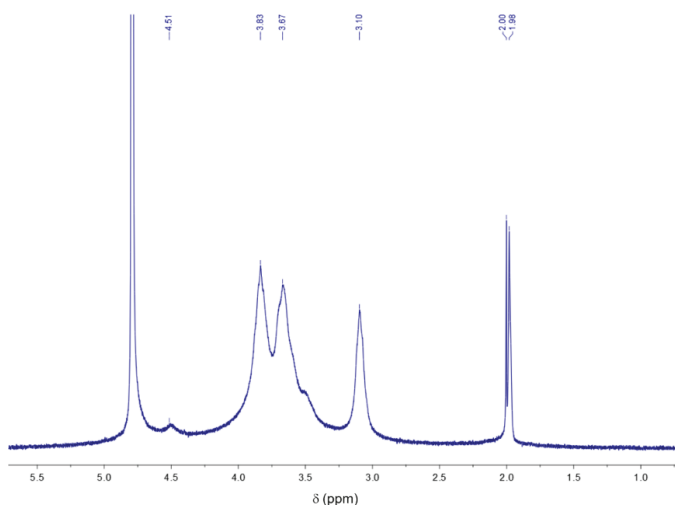


Figure 5. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of pure chitosan dissolved in $\text{DCl/D}_2\text{O}$ ($\text{pH}\sim 4$), analyzed at 400 MHz, 25 $^\circ\text{C}$, at a concentration of 8 mg mL^{-1} .

Figura 5. Espectro $^1\text{H-RMN}$ para la quitosana pura, disuelta en $\text{DCl/D}_2\text{O}$ ($\text{pH}\sim 4$), analizada a 400 MHz, 25 $^\circ\text{C}$, a una concentración de 8 mg mL^{-1} .

Estimation of the degree of acetylation (DA)

The DA of the chitosan was estimated from spectroscopic methods. The FTIR method involves correlating the absorbance bands of *N*-acetyl-glucosamine residue (1320 cm^{-1} , C-H flexion from $-\text{CH}_3$ acetamide group) considered an internal reference band (1420 cm^{-1}). By applying equation 2, the chitosan DA was calculated as 16.36 %. On the other hand, the estimation method from $^1\text{H-RMN}$ spectroscopy analysis compares characteristic peaks of the acetylated and deacetylated residual units by integration of signals. According to equation (3), the DA was estimated at 15.87 %. The value obtained from both methods is similar, and the result is approximated to the data reported in similar studies (DA \sim 11 %) (Puvvada *et al.*, 2012).

Determination of Viscosity-average molecular weight

Viscosimetry is the most used method to estimate the average molecular weight of chitosan. It is a simple and non-absolute method since it requires the correlation between the intrinsic viscosity and the molecular weight of the polymer (Peniche *et al.*, 2008). The intrinsic viscosity of chitosan was calculated by extrapolating the viscosity measurements to zero concentration from the ordinate at the origin of the line, applying the Huggins equation. Then, the M_v of the chitosan sample was estimated at close to 170 kDa by applying equation (4). This result is classified as low molecular weight (LMW < 300 kDa) (Joseph *et al.*, 2021).

In general, it has been found that LMW chitosan exhibits its lower viscosity and density, better solubility in aqueous solutions, and higher penetration capacity into cells. Likewise, some authors have reported that LMW chitosan manifests a more significant inhibitory effect against phytopathogens (Meng *et al.*, 2010). Taken together, the LMW and the high DA (84.13 %) factors suggest that the obtained biopolymer is a candidate for potential applications such as wound healing, food preservatives, wastewater treatment, and protein drug delivery systems (Joseph *et al.*, 2021).

Thermogravimetric analysis

Thermal stability is an essential factor in determining the potential applications of biomaterials. The polysaccharides usually have an amorphous structure that can quickly hydrate in a solid-state. Chitin requires high thermal energy to dissociate its characteristic crystalline structure (Wang *et al.*, 2013). It is reported that the primary thermal effect of this polysaccharide is dependent on the molecular weight and the DA of the sample (Alonso *et al.*, 1983).

The thermogravimetric (TG) and differential thermogravimetric (DTG) curves for the exoskeleton, chitin, and pure chitosan are displayed in Figure 6. The thermograms exhibit two different thermal steps for the samples. The former occurs below 145 $^\circ\text{C}$, associated with free water evaporation (3.5-10 %). Chitin sample shows 3.5 % weight loss from water, which represents a lower amount than the other samples. This result is concomitant with the crystalline structure of chitin. As previously stated, chitin obtained from *Farfantepenaeus californiensis* shrimp waste is conformed mainly by α -chitin allomorph. This molecular arrangement contributes to the sample's lower hydrophobicity and water permeability.

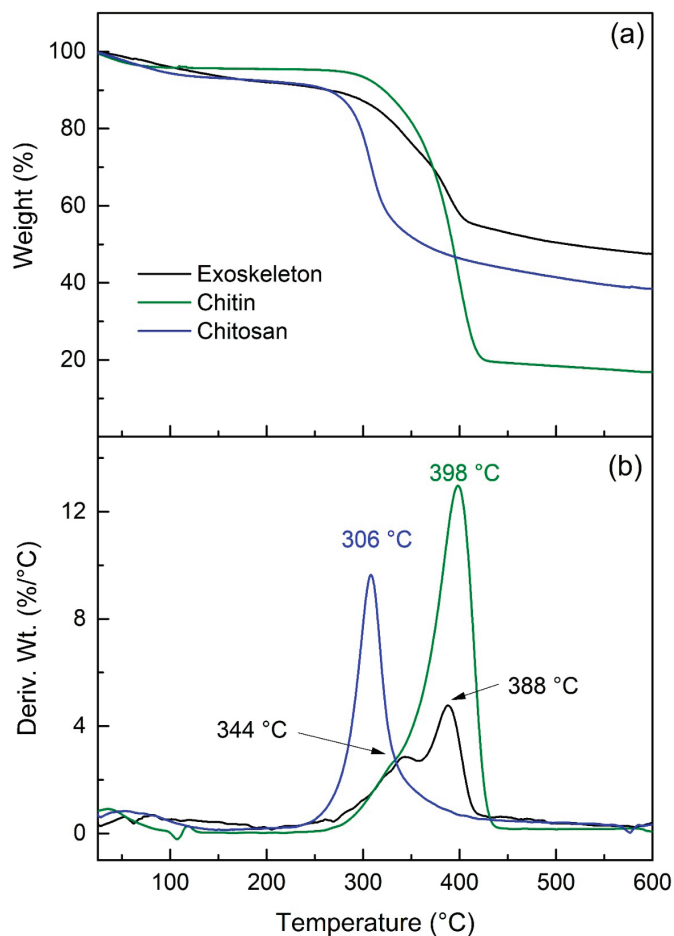


Figure 6. Thermogravimetric curve (a) and differential thermogravimetric analysis (b) for the samples: exoskeleton, chitin, and pure chitosan.

Figura 6. Curva termogravimétrica (a) y análisis termogravimétrico diferencial (b) para las muestras: exoesqueleto, quitina y quitosana pura.

The second thermal event of chitin occurs between 258 °C and 438 °C with a maximum rate of 398 °C. This remarkable weight loss (76%) corresponds to degradation of the pyranose ring of polysaccharide, which includes dehydration of the saccharide ring, depolymerization, and decomposition of chitin molecular units (Paulino *et al.*, 2006). In the exoskeleton sample, two thermal steps are exhibited between 266–422 °C, piked at 344 and 388 °C, respectively. This double thermal event can be attributed to the polysaccharide structure degradation, which adopts different conformations and types of interaction associated with minerals, proteins, and pigments into the exoskeleton matrix (Juárez-de la Rosa *et al.*, 2015).

As expected, the chitosan sample exhibits lower thermal stability than chitin. The degradation of the polymer occurs in the range of 230–400 °C, whose maximum peak is found at 306 °C. This effect can be attributed to the preponderance of the non-acetylated units and the transition from the typical chitin crystalline regions to the distinct amorphous zones of chitosan (Alonso *et al.*, 1983). In addition, a progressive weight loss is observed above 440 °C due to the formation of gas molecules such as CO, CO₂, and H₂O (Wang *et al.*, 2013).

CONCLUSIONS

Chitin and chitosan have been successfully produced from the *Farfantepenaeus californiensis* brown shrimp exoskeleton. The experimental chemical procedure allows obtaining a 33 % yield of chitin and 23 % of chitosan. Also, chitosan has a high degree of deacetylation (84.13 %), and low viscosity-average molecular weight (170 kDa). This work contributes to the physicochemical study of chitin and chitosan from this species. The results provide the baseline information for utilizing these biopolymers in promising applications such as wound healing, food preservatives, wastewater treatment, protein drug delivery systems. Therefore, the chitinous waste from the Sea of Cortez coast represents a significant source for preparing these biopolymers.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Dr. Refugio Pérez-González (Spectroscopy Laboratory) and Dra. Irela Santos Saucedo from (Thermal Analysis Laboratory) from Department of Polymers and Materials of the University of Sonora for the technical support. Likewise, the authors acknowledge Dr. Marcelino Montiel-Herrera from the Department of Medicine and Health Sciences of the University of Sonora, and M.I.I. Luis Carlos Martínez Castro from the Research Center for Food and Development (CIAD) for the technical assistance.

REFERENCES

- Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., Elsabee, M.Z., 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* 99, 1359–1367.
- Alonso, J.G., Peniche-Covas, C., Nieto, J.M., 1983. Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan by thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis* 28, 189–193.
- Argüelles, W., Heras Ángeles, Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., Miralles, B., Peniche C., San Roman J., 2004. Caracterización de quitina y quitosano. In: *Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú, pp. 157–206.
- Argüelles-Monal, W.M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Recillas-Mota, M.T., Montiel-Herrera, M., 2018. Chitosan Derivatives: Introducing New Functionalities with a Controlled Molecular Architecture for Innovative Materials. *Polymers* 10, 342.
- Association of Official Analytical Chemists, 1990. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 15th edition. Arlington, Virginia.
- Barbosa-Saldaña, M. de L., Díaz-Jaimes, P., Uribe-Alcocer, M., 2012. Variación morfológica del camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) en el Pacífico mexicano. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83.
- Beane, P., Lizardi-Mendoza, J., Healy, M., 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 145–150.
- Brungerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M., 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42, 3569–3580.
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca), 2018. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2018 (Anual No. 2018). Mazatlán, Sinaloa, México.
- Dahmane, E.M., Taourirte, M., Eladlani, N., Rhazi, M., 2014. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from *Parapenaeus longirostris* from Moroccan Local Sources. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* 19, 342–351.
- Díaz-Rojas, E.I., Argüelles-Monal, W.M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J., Goycoolea, F.M., 2006. Determination of Chitin and Protein Contents During the Isolation of Chitin from Shrimp Waste. *Macromolecular Bioscience* 6, 340–347.
- Do Nascimento Marques, N., dos Santos Alves, K., Vidal, R.R.L., da Silva Maia, A.M., Madruga, L.Y.C., Curti, P.S., de Carvalho Balaban, R., 2020. Chemical Modification of Polysaccharides and Applications in Strategic Areas. In: La Porta, F. de A., Taft, C.A. (Eds.), *Emerging Research in Science and Engineering Based on Advanced Experimental and Computational Strategies*, Engineering Materials. Springer International Publishing, Cham, pp. 433–472.
- EL Knidri, H., Dahmani, J., Addaou, A., Laajeb, A., Lahsini, A., 2019. Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules* 139, 1092–1102.
- Ghormade, V., Pathan, E.K., Deshpande, M.V., 2017. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? *International Journal of Biological Macromolecules*, 11th APCCS-2016-Chemistry, Environmental, Biotechnology and Biomedical Aspects of Chitin and Chitosan 104, 1415–1421.
- Hou, F., Ma, X., Fan, L., Wang, D., Ding, T., Ye, X., Liu, D., 2020. Enhancement of chitin suspension hydrolysis by a combination of ultrasound and chitinase. *Carbohydrate Polymers* 231, 115669.
- Joseph, S.M., Krishnamoorthy, S., Paranthaman, R., Moses, J.A., Anandharamakrishnan, C., 2021. A review on source-

- specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2, 100036.
- Juárez-de la Rosa, B.A., May-Crespo, J., Quintana-Owen, P., González-Gómez, W.S., Yañez-Limón, J.M., Alvarado-Gil, J.J., 2015. Thermal analysis and structural characterization of chitinous exoskeleton from two marine invertebrates. *Thermochimica Acta* 610, 16–22.
- Kurita, K., 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Mar Biotechnol* 8, 203–226.
- Meng, X., Yang, L., Kennedy, J.F., Tian, S., 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers* 81, 70–75.
- Meraz-Sánchez, R., Madrid-Vera, J., Cisneros-Mata, M.Á., Herrera, D.C., 2013. An Approach to Assessment to Population of the Brown Shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), as a Management Fisheries Tool in the Southeastern Gulf of California. *Open Journal of Marine Science* 3, 40–47.
- Mohammed, M.H., Williams, P.A., Tverezovskaya, O., 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids* 31, 166–171.
- Palpandi, C., Shanmugam, V., Shanmugam, A., 2009. Extraction of chitin and chitosan from shell and operculum of mangrove gastropod *Nerita (Dostia) crepidularia* Lamarck. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 1, 198–205.
- Pastor de Abram, A., 2004. Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones, 1st ed. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú.
- Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C., Nozaki, J., 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crasyalides. *Carbohydrate Polymers* 64, 98–103.
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F.M., 2008. Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. In: *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier, pp. 517–542.
- Percot, A., Viton, C., Domard, A., 2003. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules* 4, 12–18.
- Puvvada, Y.S., Vankayalapati, S., Sukhavasi, S., 2012. Extraction of chitin from chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry. *International Current Pharmaceutical Journal* 1, 258–263.
- Rábago-Quiroz, C.H., Zepeda-Benítez, V.Y., López-Martínez, J., Padilla-Serrato, J.G., Rábago-Quiroz, C.H., Zepeda-Benítez, V.Y., López-Martínez, J., Padilla-Serrato, J.G., 2019. Biometric relationships for commercially important penaeid shrimp species on the east coast of the Gulf of California. *Latin american journal of aquatic research* 47, 716–722.
- Ravi Kumar, M.N.V., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 46, 1–27.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603–632.
- Rinaudo, M., Milas, M., Dung, P.L., 1993. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules* 15, 281–285.
- Rødde, R.H., Einbu, A., Vårum, K.M., 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers* 71, 388–393.
- Sannan, T., Kurita, K., Iwakura, Y., 1976. Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. *Die Makromolekulare Chemie* 177, 3589–3600.
- Sierra, D.M.E., Orozco, C.P.O., Rodríguez, M.A.Q., Villa, W.A.O., 2013. Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica* 18, 260–266.
- Socrates, G., 2001. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd ed. John Wiley & Sons.
- Tanaka, Y., Mizuguchi, H., Katayama, T., Simpson, K.L., Chichester, C.O., 1976. The biosynthesis of astaxanthin—XVI. The carotenoids in crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 54, 391–393.
- Vårum, K.M., Antohonsen, M.W., Grasdalen, H., Smidsrød, O., 1991. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research* 211, 17–23.
- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z., Xue, C., 2013. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydrate Polymers* 92, 90–97.
- Younes, I., Rinaudo, M., 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs* 13, 1133–1174.

Análisis químico-proximal, fitoquímico y potencial bacteriostático de *Eichhornia crassipes*

Chemical-proximal, phytochemical analysis, and bacteriostatic potential, of *Eichhornia crassipes*

López-Medina EN¹, Álvarez-García R¹, Téllez-Jurado A¹, Aguayo-Rojas J², Tovar-Jiménez X^{1*}

¹ Posgrado en Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, Carr. Pachuca-Cd. Sahagún km 20, Rancho Luna, Ex-Hacienda de Santa Bárbara, CP 43830, Zempoala, Hidalgo, México.

² Químico en Alimentos, Universidad Autónoma de Zacatecas, Carr. Zacatecas-Guadalajara km 6, La Escondida, CP 98160, Zacatecas, Zacatecas, México.

RESUMEN

Una de las preocupaciones de la sociedad son los problemas de salud asociados a la resistencia bacteriana a múltiples fármacos, es por ello, que la búsqueda de productos naturales con actividad antimicrobiana es relevante. En este sentido, se ha demostrado que *Eichhornia crassipes* posee propiedades biológicas. Por lo que, el objetivo del trabajo fue determinar la composición químico-proximal y fitoquímica de extractos de *E. crassipes* obtenidos por Maceración y Soxhlet con la finalidad evaluar su potencial bacteriostático. Los resultados del análisis químico-proximal indicaron que la fracción hoja presenta alta concentración de proteína ($32.67 \pm 0.25\%$) y holocelulosa ($65.34 \pm 0.06\%$), mientras que, el análisis fitoquímico de las fracciones evaluadas (hoja (Ho), bulbo (B) y hoja+bulbo (Ho+B)), indica la presencia de flavonoides, fenoles, taninos y saponinas, principalmente. Siendo los extractos acuosos los que presentaron mayor concentración de compuestos fitoquímicos antimicrobianos. Asimismo, el extracto etanólico obtenido por Maceración de la fracción Ho+B (18.53 mm) y el extracto acuoso de la fracción Ho obtenido por Soxhlet (18.40 mm) presentaron mayor inhibición contra *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto etanólico y acuoso obtenido por el método Soxhlet (11.97, 11.93 mm, respectivamente) de la fracción Ho mostraron mayor inhibición contra *Salmonella* sp.

Palabras clave: Lirio acuático, composición químico-proximal, fitoquímicos, antimicrobianos.

ABSTRACT

Currently, public health concerns are bacterial resistance to multiple antibiotics. This has driven the search for natural products with therapeutic effects. In this sense, it has been found that *Eichhornia crassipes*, derived from its phytochemical composition, possesses biological properties. The present study focuses on determining chemical-proximal and phytochemical composition of *E. crassipes* extracts obtained by maceration and Soxhlet and evaluating their bacteriostatic potential. The chemical-proximal composition indicated that leaf fraction presents a high protein ($32.67 \pm 0.25\%$) and holocellulose ($65.34 \pm 0.06\%$) concentrations; phytochemical analysis of different plant fractions (leaf (Ho), bulb (B) and leaf

+ bulb (Ho+B)) indicates mainly the presence of flavonoids, phenols, tannins and saponins. Furthermore, aqueous extracts presented the highest concentration of phytochemical compounds. Ethanolic extract obtained by maceration of Ho+B fraction (18.53 mm) and aqueous extract of Ho fraction obtained by Soxhlet (18.40 mm) showed more significant inhibition against *Staphylococcus aureus*. In contrast, the ethanolic and aqueous extracts obtained by the Soxhlet method (11.97, 11.93 mm, respectively) of Ho fraction showed the highest inhibition against *Salmonella* sp.

Keywords: Water hyacinth, chemical proximal composition, phytochemicals, antimicrobials.

INTRODUCCIÓN

Eichhornia crassipes mejor conocido como lirio acuático es considerado como una planta nociva por su gran adaptabilidad en diversos hábitats ya que tiene la capacidad de modificar las características fisicoquímicas de los cuerpos de agua dulce provocando problemas, debido a que reduce la cantidad de oxígeno disuelto e impide el paso de luz evitando así el crecimiento de la flora y fauna acuática (Kriticos y Brunel, 2016; Gabriel *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2018). Para controlar su crecimiento, se han utilizado métodos físicos, mecánicos (acumulación de tejido vegetal en las orillas de los cuerpos de agua), químicos (pesticidas) y biológicos (*Neochetina eichhorniae*) (Reddy *et al.*, 2019). Sin embargo, no son suficientes para su erradicación, además de ser procesos costosos a causa del alto contenido de humedad (~95%) que presenta, lo que encarece su transporte y disposición (Yan *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2019). A partir de esto surge la necesidad de desarrollar estrategias para el manejo sustentable del lirio, que permitan sanear y proteger cuerpos de agua en el país. En este sentido, una estrategia puede ser el aprovechamiento de sus propiedades biológicas, ya que empíricamente las hojas, raíces y flores son empleadas como analgésico, antimicrobiano, sedante, etc., debido a la presencia de compuestos fitoquímicos como alcaloides, taninos, flavonoides y compuestos fenólicos (Tyagi *et al.*, 2017). Desde la antigüedad, la población mundial ha empleado plantas para tratar diversos padecimientos. Sin embargo, cada día, el estilo de vida de los países en desarrollo ha ocasionado que se lleven

a cabo cambios en el consumo de alimentos, lo que ha provocado el aumento de enfermedades y una dependencia a la automedicación; aumentando así, la incidencia de problemas como: obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiacas, cáncer y resistencia bacteriana a *Salmonella* sp. y *Staphylococcus aureus* que pueden provocar gastroenteritis, fiebre tifoidea, fiebre escarlata, mastitis, entre otros padecimientos (Mohan *et al.*, 2019; Anand *et al.*, 2019; Shivaee *et al.*, 2021). Por lo que, en la actualidad se están buscando alternativas de origen natural con fines medicinales que puedan ser utilizadas para obtener ingredientes funcionales. Por lo antes mencionado, el objetivo del trabajo fue determinar la composición químico proximal y fitoquímica de extractos de *Eichhornia crassipes* con la finalidad evaluar su potencial bacteriostático.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y procesamiento de la muestra

El muestreo se realizó en otoño del 2019 en la presa San Antonio Huasca de Ocampo, Hidalgo donde se encontraron plantas jóvenes ya que sólo presentaban bulbos globosos unidos a hojas; una parte de las plantas colectadas se fraccionaron en hoja (Ho) y bulbo (B) y a otra parte solo se les retiró la raíz, esta última fue considerada como hoja+bulbo (Ho+B). Posteriormente, los especímenes se sometieron a secado (40 °C por 48 h), molienda y tamizado en una malla con tamaño de poro de 425 µm, las muestras se codificaron y guardaron en un recipiente hermético en la oscuridad hasta su uso.

Análisis proximal

El análisis proximal de las fracciones de las plantas se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por la Association Official of Analytical Chemists (AOAC, 2002), para lo cual, se cuantificó el contenido de cenizas (No. 923.03), grasas totales (No. 920.39), proteínas totales (No. 960.52), fibra cruda (962.09). Además, se cuantificaron los carbohidratos solubles por diferencia del porcentaje del resto de los componentes.

Composición química

La composición química de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a las normas estandarizadas TAPPI (por sus siglas en inglés, Technical Association of Pulp and Paper Industry), se determinó el contenido de pentosanos (T 233 cm-84, 1984), holocelulosa (T 211 om-93, 1993), celulosa (T 212 cm-12, 2015), α y β - celulosa (T 203 cm-99, 2015).

Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos se planteó un diseño factorial mixto, los factores evaluados fueron: fracción de la planta (Ho, B y Ho+B), método de extracción (maceración y Soxhlet) y polaridad del solvente (hexano, etanol y agua) (Tabla 1).

En el caso del extracto hexánico y etanólico se tomaron 10 g de harina de *E. crassipes* tamizada y se adicionaron 150 mL del solvente, mientras que, para obtener el extracto

Tabla 1. Diseño de experimentos para los extractos.

Table 1. Design of experiments of the extracts.

Método	Solvente	Fracción		
		Hoja	Bulbo	Hoja+Bulbo
Maceración	Hexano	M-H-Ho	M-H-B	M-H-Ho+B
	Etanol	M-E-Ho	M-E-B	M-E-Ho+B
	Agua	M-A-Ho	M-A-B	M-A-Ho+B
Soxhlet	Hexano	S-H-Ho	S-H-B	S-H-Ho+B
	Etanol	S-E-Ho	S-E-B	S-E-Ho+B
	Agua	S-A-Ho	S-A-B	S-A-Ho+B

M: Maceración, S: Soxhlet, H: Hexano, E: Etanol, A: Agua, Ho: Hoja, B: Bulbo, Ho+B: Hoja+Bulbo

acuoso, la harina de *E. crassipes* residual del proceso de extracción por Soxhlet con hexano se reutilizó, con la finalidad de aprovechar el residuo y determinar si aún presentaba fitoquímicos con propiedades biológicas, por lo cual, una vez que la muestra se secó a 40 °C por 24 h, se pesaron 10 g de esta harina y se adicionaron 150 mL de agua.

A partir de lo anterior, el proceso de extracción por maceración se llevó a cabo durante 2 h a 180 rpm (agitación orbital), al cabo de este tiempo las muestras se mantuvieron en oscuridad por 8 días a 4 °C. Mientras que, el proceso de extracción por Soxhlet se llevó a cabo a una velocidad de 6 flujos/h durante 20 h para hexano (H), 6 h para etanol (E) y 6 h para agua (A). Posteriormente, se realizaron filtraciones sucesivas con papel filtro estándar y filtro whatman No. 4.

Todos los extractos se sometieron a rotaevaporación para su concentración y finalmente se llevaron a sequedad en una estufa de aire forzado a 40 °C por 48 h. Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su análisis.

Perfil Fitoquímico

A partir de los extractos obtenidos mediante extracción Soxhlet y maceración se determinó la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides totales, fenoles totales, taninos, triterpenos, quinonas, cumarinas y carotenoides siguiendo las recomendaciones de Sarker *et al.* (2006), para su posterior cuantificación.

Cuantificación fitoquímica

A partir de los extractos obtenidos mediante extracción Soxhlet y maceración se cuantificó el contenido de alcaloides de acuerdo al protocolo de Shamsa *et al.* (2007); el cual consistió en remover las clorofilas con éter etílico, para posteriormente separar los alcaloides de los compuestos fenólicos empleando cloroformo, para finalmente determinar el contenido de alcaloides obteniendo la absorbancia a 420 nm. Los resultados se expresaron en mg cinconina/100 gramos de extracto seco (ges). Mientras que, para el contenido de flavonoides totales se tomaron 0.5 mL de extracto y se adicionó 0.5 mL de una solución etanólica de $AlCl_3$ al 2 %. Se incubó 1 h a temperatura ambiente y se leyó a una absorbancia de 420 nm. Los resultados se expresaron en mg catequina/100 ges (Kumazawa *et al.*, 2004).

Para determinar el contenido de fenoles totales se tomaron 50 µL de extracto, se adicionaron 800 µL de agua

y 100 µL de Folin-Ciocalteu; se dejaron reposar 8 min y posteriormente se adicionaron 50 µL de Na₂CO₃ al 20 %. Se incubó durante 1 h en oscuridad y se leyó la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresaron en mg ácido gálico/100 ges (Singleton y Rossi, 1965). Por otra parte, se cuantificó el contenido de taninos por medio del protocolo propuesto por Gbadamosi y Kalejaye (2017); para lo cual, se tomaron 5 mL de extracto y se disolvieron en 20 mL de metanol:agua al 50 %, la mezcla se homogenizó en baño María a 80 °C por 1 h, se filtró y se adicionaron 20 mL de agua con 2.5 mL de Folin-Ciocalteu, 10 mL de Na₂CO₃ al 17 % y se aforó a 100 mL; se mantuvo en reposo 20 min y se leyó la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresaron en mg ácido tánico/100 ges. En cuanto, al contenido de saponinas a 2 mL de extracto se adicionaron 7 mL del reactivo Liebermann-Burchard, se agitó y se dejó en reposo durante 20 min; se leyó la absorbancia a 528 nm. Los resultados se expresaron en mg saponina triterpénica/100 ges (Lozano *et al.*, 2012). Para el caso del contenido de cumarinas se tomaron 24 mg de extracto seco al cual se le adicionaron 50 mL de metanol:agua (80:20), se realizó una segunda dilución, tomando 8 mL de la solución y se aforó a 25 mL con metanol:agua (80:20) y se leyó la absorbancia a 275 nm. Los resultados se expresaron en mg cumarinas/100 ges (Soares e Silva *et al.*, 2012). Finalmente, el contenido de caroteoides se cuantificó, para lo cual a 0.1 g de extracto se le adicionó 1 mL de una solución acetona:etanol (1:1), se dejó reposar 24 h a 4 °C; se filtró y se transfirió a un embudo de separación adicionando 5 mL de hexano y 2.5 mL de agua, se dejó reposar 30 min y se leyó a 470 nm. Los resultados se expresaron en µg de β-caroteno equivalente/100 g, empleando el coeficiente de extinción molar de 2500 del β-caroteno. Se emplea como blanco hexano (Campos *et al.*, 2006). Donde: A= Absorbancia de la muestra, V= Volumen total del extracto, A^{1%}_{1cm} = Coeficiente de absortividad del β-caroteno (2500), Pmx = Peso de muestra en gramos.

$$\mu\text{g de } \beta\text{-caroteno equiv/100g} = \frac{AxVx10^6}{A_{1cm}^{1\%}x100xPmx}$$

Actividad bacteriostática

La actividad bacteriostática se llevó a cabo mediante el método de difusión en agar, para lo cual, se empleó la bacteria Gram-negativa *Salmonella* sp. y la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Para este fin, se preparó un pre-inóculo en caldo nutritivo a 37 °C durante 24 h con agitación a 200 rpm. A continuación, se inocularon placas con agar nutritivo y 150 µL del pre-inóculo ajustado a una densidad óptima de 0.2 (λ = 600 nm), se dispersó homogéneamente usando un asa de Digrafsky. Se impregnaron en discos de 6 mm de diámetro previamente esterilizados 5 µL del extracto (100 mg/mL), los cuales se depositaron simétricamente en placas de Petri usando pinzas esterilizadas, y se incubaron durante 24 h a 37 ± 2 °C para determinar el halo de inhibición. El control positivo para las bacterias fue gentamicina (160 mg/2 mL). Los resultados se expresaron como la zona de inhibición (mm) producida por el extracto (Tovar-Jiménez *et al.*, 2012).

Análisis estadístico

El análisis de los datos multivariado se llevó a cabo empleando el software estadístico Statistica versión 7.0 con la finalidad de determinar su diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico-proximal

El análisis proximal (Tabla 2), muestra que el mayor componente presente en la harina de *E. crassipes*, son los carbohidratos (~40 %), seguido del contenido de proteína siendo mayor en Ho (~33 %) y Ho+B (~23 %) que en B (~17 %); en cuanto al contenido de fibra cruda es mayor en B (~21 %) que en Ho (~16 %) y Ho+B (~19 %); para el contenido de cenizas es mayoritario en B (~20 %) que para Ho (~12 %) y Ho+B (~16 %) y finalmente para el contenido de grasas se obtiene (~1 %) para todas las fracciones evaluadas. El análisis estadístico indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre cada fracción de la planta y componente evaluado (R²_{ajustada}: 0.9997; p < 0.05). Los resultados obtenidos difieren a lo reportado por Gabriel *et al.* (2018) ya que mencionan que *E. crassipes* presenta ~40 % de carbohidratos, proteína del ~10 al 20 %, fibra cruda del ~28 al 35 %, cenizas ~15 % y grasas del ~1 %, estas diferencias se pueden deber a las condiciones del sitio de muestreo y procesamiento de la muestra, época del año y la edad de la planta como lo menciona Tovar-Jiménez *et al.* (2019), cabe mencionar que aunque ya se ha estudiado los componentes del lirio acuático en diferentes zonas geográficas de México es importante conocer su composición química proximal ya que existen pocos estudios donde se relaciona la época del año con la zona geográfica esto con la finalidad de generar estrategias de aprovechamiento de esta especie, en este sentido, no se encontraron reportes donde se haya analizado las diferentes fracciones del lirio durante otoño en la zona de muestreo de este estudio, así como el estado de madurez de la planta, observando que en general el contenido en proteína, fibra cruda y cenizas es mayor a lo reportado por la literatura (Gabriel *et al.*, 2018; Tovar-Jiménez *et al.*, 2019).

Tabla 2. Composición químico-proximal de las diferentes fracciones de *E. crassipes*.

Table 2. Chemical - proximate composition of *E. crassipes* fractions.

Componente (%)	Fracción		
	Hoja	Bulbo	Hoja + bulbo
Cenizas	12.09 ± 0.20 ^a	20.22 ± 0.29 ^c	16.41 ± 0.06 ^b
Grasa	1.36 ± 0.01 ^c	0.76 ± 0.02 ^b	0.64 ± 0.02 ^a
Proteína cruda	32.67 ± 0.25 ^c	17.21 ± 0.25 ^a	23.16 ± 0.43 ^b
Fibra cruda	15.97 ± 0.17 ^a	21.28 ± 0.19 ^c	18.82 ± 0.30 ^b
Carbohidratos solubles	37.91 ± 0.36 ^a	40.53 ± 0.42 ^b	40.97 ± 0.41 ^c
Pentosanos	9.87 ± 0.06 ^a	9.64 ± 0.14 ^a	9.66 ± 0.11 ^a
Holocelulosa	65.34 ± 0.06 ^c	59.32 ± 0.60 ^a	60.58 ± 0.72 ^b
Celulosa	28.73 ± 0.41 ^a	42.67 ± 0.67 ^b	47.29 ± 0.20 ^c
α-celulosa	25.82 ± 0.47 ^a	40.71 ± 0.37 ^b	44.73 ± 0.44 ^c
β-celulosa	1.77 ± 0.61 ^c	1.02 ± 0.22 ^a	1.45 ± 0.34 ^b

Letras iguales por fila indican que no existe diferencia estadísticamente significativa (p > 0.05)

En la tabla 2 se muestra el análisis químico realizado a la harina de *E. crassipes* donde se observa que el componente mayoritario es la holocelulosa en las fracciones evaluadas (~61 %), seguido del contenido de celulosa, siendo mayor en la fracción Ho+B (~47 %) y B (~43 %) mientras que para Ho (~29 %). Con respecto al contenido de α -celulosa es mayoritario para Ho+B (~45 %) y B (~41 %) y menor en Ho (~26 %), la cuantificación de β -celulosa es mayor en Ho (~1.8 %) respecto a B (~1 %) y Ho+B (~1.5 %), finalmente en cuanto al contenido de pentosanos en todas las fracciones evaluadas se encuentra alrededor del 9.7 %. El análisis estadístico indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre las fracciones de la planta ($R^2_{ajustada} = 0.9989$; $p < 0.05$), excepto para el contenido de pentosanos ($p > 0.05$). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Das *et al.* (2016) y Lara-Serrano *et al.* (2016) quienes indican que el contenido de celulosa se encuentra en un rango del 10 al 30 %, cabe mencionar que la celulosa es la suma de α -celulosa y β -celulosa (Yuan *et al.*, 2010) y que las principales diferencias se deben al estado de madurez de la planta, época y zona de muestreo. En cuanto al contenido de pentosanos se reportan valores de 23.7 %, lo cual, es superior a lo encontrado en este trabajo, esto se puede deber a las condiciones y tiempo de reacción para su determinación, al igual que, el estado de madurez de la planta como lo menciona Purbowatingrum *et al.* (2017). No obstante, la composición del lirio acuático sugiere que es una fuente importante de nutrimentos y que para el procesamiento de la planta es importante tomar en cuenta la época del año, zona geográfica y la fracción de la misma.

Perfil fitoquímico

Los resultados para el análisis cualitativo de metabolitos secundarios presentes en *E. crassipes* se muestran en la Tabla 3, donde se observa que los extractos obtenidos por

maceración y Soxhlet empleando agua fueron positivos para flavonoides y taninos en todas las fracciones de la planta evaluadas, al igual que en los extractos etanólicos obtenidos por Soxhlet. En el caso de alcaloides no se detectó su presencia, mientras que para saponinas y fenoles fueron positivos en los extractos acuosos, también se detectó la presencia de fenoles en los extractos etanólicos obtenidos por Soxhlet. En cuanto a los triterpenos fueron positivos en los extractos acuosos obtenidos por maceración en las tres fracciones de la planta evaluadas, así como, en los extractos hexánicos y etanólicos de bulbo; y en el extracto etanólico Ho+B, de igual forma, los extractos etanólicos de Ho, B y Ho+B obtenidos por Soxhlet fueron positivos.

Se detectó la presencia de quinonas en los extractos etanólicos y acuosos, resultado del proceso de maceración, al igual que, en los extractos hexánicos, etanólicos y acuosos obtenidos por Soxhlet. Para el caso de cumarinas sólo fue negativo en los extractos acuosos obtenidos por los dos métodos de extracción, así como, en el extracto etanólico empleando Soxhlet y la fracción B. Finalmente, los carotenoides no se detectaron en el extracto acuoso empleando maceración y B, además de los extractos acuosos empleando Soxhlet, Ho y Ho+B, así como en el extracto etanólico de bulbo obtenido por Soxhlet.

Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Prabakaran y Mani (2017) quienes determinaron la presencia de flavonoides, saponinas y triterpenos en el extracto etanólico, mientras que, para el extracto en agua reportan taninos, saponinas, flavonoides, triterpenos y alcaloides, al igual que Kandukuri *et al.* (2019) quienes reportan alcaloides, saponinas, taninos y triterpenos en extractos etanólicos. Baral *et al.* (2011) encontraron saponinas, alcaloides, taninos y triterpenos en extractos con agua. Asimismo, reportan alcaloides en el extracto hexánico (Baral *et al.*, 2011). Por otra parte, Hamid *et al.* (2013) utilizaron un solvente no

Tabla 3. Perfil fitoquímico de los extractos de *Eichhornia crassipes* obtenidos mediante maceración y Soxhlet
Table 3. Phytochemical profile of *Eichhornia crassipes* extracts obtained by maceration and Soxhlet

Fitoquímico	Maceración									Soxhlet								
	Hoja			Bulbo			Hoja+Bulbo			Hoja			Bulbo			Hoja+Bulbo		
	H	E	A	H	E	A	H	E	A	H	E	A	H	E	A	H	E	A
Flavonoides	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Shinoda	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Ácido sulfúrico	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Alcaloides																		
Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wagner	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Fenoles	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Triterpenos	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Quinonas	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Cumarinas	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Carotenoides	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-

+ Presencia, - Ausencia, H: Hexano, E: Etanol, A: Agua

polar reportando alcaloides, flavonoides, fenoles y saponinas en un extracto clorofórmico, mientras que Anusiya *et al.* (2020) reporta flavonoides, taninos y saponinas en extractos obtenidos con benceno.

En general, las variaciones de fitoquímicos detectados mediante el método Soxhlet pueden deberse a la concentración del extracto, la época y zona de muestreo y a la edad de la planta. Asimismo, de acuerdo con los resultados obtenidos, se observa mayor variedad de metabolitos en los extractos acuosos en comparación con los extractos hexánicos y etanólicos para los dos métodos de extracción, seguido de los extractos etanólicos obtenidos por el método Soxhlet. Aunado a esto, factores como la temperatura, luz, agitación y concentración de fitoquímicos juegan un papel muy importante en cuanto a su detección (Khalid *et al.*, 2020), ya que se determinó mayor variedad de metabolitos en los extractos mediante Soxhlet (caliente) que en maceración (frío), asimismo los resultados positivos en Ho o B que fueron negativos en Ho+B pueden atribuirse a la concentración presente en cada fracción. No obstante, a pesar de la escasa detección de metabolitos en extractos hexánicos y etanólicos se procedió a la cuantificación de fitoquímicos con la finalidad de comprobar su ausencia.

Cuantificación de fitoquímicos

Los resultados de la cuantificación de fitoquímicos se muestran en la Tabla 4, donde se observa que independientemente de la fracción de la planta y método de extracción el contenido de flavonoides y fenoles totales es superior al resto de los componentes.

El contenido de fenoles totales fue mayor en el extracto acuoso de la fracción hoja obtenido por maceración (749.20 mg ácido gálico/100 ges). De acuerdo con lo reportado en la literatura, los resultados son superiores a lo obtenido por Surendraraj *et al.* (2013) quienes emplearon un extracto obtenido por maceración de la fracción hoja de *E. crassipes* (200 mg ácido gálico/100 gms). De igual manera, los resultados obtenidos para el extracto acuoso de las hojas del lirio acuático usando el método de extracción Soxhlet es superior (301 mg ácido gálico/100 ges) a lo reportado por Rorong *et al.* (2012) quienes cuantificaron el contenido de fenoles totales (0.1 mg ácido gálico/100 gms) en un extracto acuoso a partir de las hojas del lirio acuático ocupando el método de maceración.

Respecto al contenido de flavonoides, se observa en la Tabla 4 que el extracto hexánico de la fracción Ho+B obtenido por el método maceración fue mayor (218.39 mg catequina/100 ges) en comparación con el método Soxhlet para la misma fracción (146.64 mg catequina/100 ges), pero similar a lo obtenido en el extracto etanólico para la fracción hoja (217.57 mg catequina/100 ges). Lenora y Senthilkumar (2017) mencionan que el extracto hexánico de la planta completa de *E. crassipes* obtenido por método soxhlet presentan flavonoides (10 mg ácido gálico/g), al igual que lo menciona Rorong *et al.* (2012) en un extracto metanólico al 80 % (3.3 mg ácido gálico/g) y Liu *et al.* (2017) para un extracto etanólico (16 mg ácido gálico/g).

En cuanto al extracto acuoso, la fracción Ho presentó la mayor concentración de taninos (5.62 mg ácido tánico/100 ges) cuando se obtiene por el método Soxhlet seguido del extracto acuoso obtenido por maceración de la fracción Ho+B (4.43 mg ácido tánico/100 ges). Mohamed *et al.* (2019) y Adalakun *et al.* (2016) mencionan que el extracto etanólico de la planta completa de *E. crassipes* presenta taninos (3.13 µg ácido tánico/mg extracto, 0.27 µg ácido tánico/mg extracto, respectivamente).

En relación a los resultados de saponinas se encontró que el extracto acuoso de la fracción B obtenido por el método Soxhlet presenta mayor contenido de este fitoquímico (6.73 mg saponina triterpénica/100 ges). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Adalakun *et al.* (2016), quienes emplearon la planta completa y determinaron la presencia de saponinas (1.27 µg /mg muestra seca).

Por otra parte, el resultado del contenido de carotenoides demostró que el extracto etanólico de la fracción Ho obtenido por Soxhlet es el que presenta un alto contenido (10.56 mg β-caroteno/100 ges) en comparación con el resto de extractos evaluados. Kandukuri *et al.* (2009) indican que el extracto metanólico *E. crassipes* presenta carotenoides (1.8 mg de carotenoides/g). Finalmente, para el contenido de cumarinas los resultados muestran que el extracto obtenido por maceración de la fracción Ho presenta mayor concentración (0.97 mg cumarina/100 ges). El análisis estadístico indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre los métodos de obtención del extracto y las fracciones de la planta evaluadas ($R^2_{ajustada}$: 0.9996; $p < 0.05$).

En general, estas variaciones en el contenido de fitoquímicos pueden ser atribuidas a las condiciones climáticas (temperatura, luz), forma de obtención de los extractos (relación muestra: solvente, velocidad de agitación, polaridad de los solventes, procesamiento de la muestra), la edad y fracciones de la planta a evaluar (Azwanida, 2015; Adalakun *et al.*, 2016). Por lo anterior, se puede evidenciar que la fracción Ho es una fuente importante de fitoquímicos antimicrobianos, lo cual coincide con lo reportado Surendraraj *et al.* (2013) y Rorong *et al.* (2012), sin embargo, es importante determinar su potencial para identificar la fracción más viable para este fin, así como la estrategia a seguir para obtener los mejores resultados bajo las condiciones del estudio.

Actividad bacteriostática

Los resultados de la actividad bacteriostática se muestran en la Tabla 5, donde en general, se observa que los extractos etanólicos y acuosos fueron más eficaces para inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos para humanos. El extracto etanólico de la fracción Ho+B obtenido por maceración (halo de inhibición: 18.53 mm) presentó la mayor inhibición de la bacteria *S. aureus*, al igual que el extracto acuoso obtenido por Soxhlet (halo de inhibición: 18.40 mm). Igualmente, el extracto etanólico y acuoso obtenido por Soxhlet de la fracción Ho (halo de inhibición: 11.97 mm, 11.93 mm, respectivamente) y Ho+B (halo de inhibición: 11.50 mm, 11.40 mm, respectivamente) son los que presentan mayor

Tabla 4. Cuantificación de fitoquímicos de los extractos hexánicos, etanólicos y acuosos de *Eichhornia crassipes* obtenidos mediante Maceración y Soxhlet**Table 4.** Phytochemicals quantification of hexane, ethanolic and aqueous extracts from *Eichhornia crassipes* obtained by Maceration and Soxhlet

Fitoquímico	Método-Solvente	Hoja	Bulbo	Hoja+Bulbo
Fenoles totales (mg ácido gálico/100 ges)	M-H	259.35 ± 2.58 ^g	278.71 ± 1.29 ^j	252.47 ± 3.25 ^f
	M-E	236.99 ± 2.69 ^e	268.82 ± 2.98 ⁱ	226.24 ± 3.25 ^d
	M-A	749.20 ± 4.58 ^o	224.87 ± 3.33 ^d	671.82 ± 22.3 ⁿ
	S-H	314.84 ± 2.58 ^l	162.15 ± 3.25 ^b	225.38 ± 3.25 ^d
	S-E	265.38 ± 2.69 ^h	138.06 ± 2.23 ^a	210.75 ± 3.25 ^c
	S-A	301.67 ± 7.40 ^k	561.21 ± 5.59 ^m	891.58 ± 2.55 ^p
Flavonoides (mg catequina/100 ges)	M-H	133.44 ± 0.82 ^h	86.98 ± 3.43 ^f	218.39 ± 1.43 ^m
	M-E	74.97 ± 2.51 ^d	29.54 ± 1.04 ^b	53.94 ± 3.11 ^c
	M-A	146.92 ± 2.12 ^l	12.13 ± 0.21 ^a	155.49 ± 6.78 ^k
	S-H	152.14 ± 4.23 ^j	102.65 ± 8.58 ^g	146.64 ± 1.65 ⁱ
	S-E	217.57 ± 3.78 ^m	10.05 ± 0.48 ^a	29.91 ± 0.95 ^b
	S-A	150.15 ± 5.99 ^j	77.98 ± 2.75 ^e	184.51 ± 3.27 ^l
Taninos (mg ácido tánico/100 ges)	M-H	0.30 ± 0.0 ^a	0.84 ± 0.00 ^d	0.31 ± 0.00 ^a
	M-E	1.59 ± 0.01 ^h	1.23 ± 0.00 ^g	1.01 ± 0.00 ^f
	M-A	2.59 ± 0.04 ^j	0.94 ± 0.03 ^f	4.43 ± 0.11 ^k
	S-H	0.40 ± 0.01 ^b	1.57 ± 0.01 ^h	0.56 ± 0.01 ^c
	S-E	0.99 ± 0.00 ^f	0.95 ± 0.00 ^f	1.01 ± 0.01 ^f
	S-A	5.62 ± 0.19 ^j	1.55 ± 0.03 ^h	1.92 ± 0.02 ⁱ
Saponinas (mg saponina triterpénica/100 ges)	M-H	2.60 ± 0.06 ^g	1.81 ± 0.01 ^c	2.51 ± 0.51 ^f
	M-E	2.14 ± 0.02 ^d	2.13 ± 0.02 ^d	2.30 ± 0.09 ^e
	M-A	4.31 ± 0.06 ^j	2.86 ± 0.06 ^h	3.41 ± 0.14 ⁱ
	S-H	2.84 ± 0.01 ^h	2.23 ± 0.07 ^e	2.67 ± 0.03 ^g
	S-E	3.49 ± 0.02 ^l	1.07 ± 0.01 ^a	1.57 ± 0.02 ^b
	S-A	6.35 ± 0.13 ^k	7.06 ± 0.11 ^m	6.73 ± 0.02 ^l
Alcaloides (mg cinconina/100 ges)	M-H	0	0	0
	M-E	0	0	0
	M-A	0	0	0
	S-H	0	0	0
	S-E	0	0	0
	S-A	0	0	0
Carotenoides (mg β-caroteno /100 ges)	M-H	0.34 ± 0.08 ^c	0.06 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.01 ^b
	M-E	1.03 ± 0.08 ^e	0.22 ± 0.03 ^b	0.59 ± 0.02 ^d
	M-A	0 ^a	1.80 ± 0.17 ^g	0 ^a
	S-H	1.95 ± 0.14 ^g	0.27 ± 0.02 ^c	0.17 ± 0.02 ^b
	S-E	10.56 ± 0.26 ^j	2.36 ± 0.39 ^h	1.39 ± 0.14 ^f
	S-A	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Cumarinas (mg coumarina /100 ges)	M-H	0.97 ± 0.02 ^h	0.15 ± 0.04 ^c	0.51 ± 0.03 ^g
	M-E	0.30 ± 0.01 ^e	0.08 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.01 ^c
	M-A	0.12 ± 0.00 ^c	0.02 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.00 ^b
	S-H	0.45 ± 0.01 ^f	0.14 ± 0.01 ^c	0.23 ± 0.03 ^d
	S-E	0.08 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
	S-A	0.013 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^b	0.09 ± 0.00 ^b

Letras iguales por cada fitoquímico evaluado indican que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

ges: gramos de extracto seco, M: Maceración, S: Soxhlet, H: Hexano, E: Etanol, A: Agua.

inhibición contra *Salmonella* sp. El análisis estadístico indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre los métodos de obtención del extracto y las fracciones de la planta evaluadas ($R^2_{ajustada}: 0.9963$; $p < 0.05$).

En general, los resultados son similares a los obtenidos por Fareed *et al.* (2008), ya que mencionan que los extractos acuosos y etanólicos de hojas de *E. crassipes* presentan

actividad antimicrobiana contra las cepas *S. aureus* y *Salmonella choleraesuis*, asimismo, Joshi y Kaur (2013) evaluaron la actividad bacteriostática de extractos etanólicos y acuosos de la planta *E. crassipes* obtenidos por el método Soxhlet concluyendo que presentan potencial contra la bacteria gram (+) del género *Staphylococcus*. Mientras que, Baral *et al.* (2011) concluyen que los extractos etanólicos obtenidos

Tabla 5. Actividad bacteriostática de extractos hexánicos, etanólicos, y acuosos de *Eichhornia crassipes* obtenidos por Maceración y Soxhlet
Table 5. Bacteriostatic activity of hexane, ethanolic, and aqueous extracts from *Eichhornia crassipes* obtained by Maceration and Soxhlet

Bacteria	Extracto	Zona de inhibición (mm)		
		Hoja	Bulbo	Hoja+Bulbo
Gram (+): <i>Staphylococcus aureus</i>	M-H	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	M-E	13.57 ± 0.06 ^e	16.50 ± 0.10 ^g	18.53 ± 0.06 ^h
	M-A	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	S-H	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	S-E	8.07 ± 0.12 ^c	9.10 ± 0.10 ^d	7.03 ± 0.06 ^b
	S-A	18.40 ± 0.10 ^h	14.40 ± 0.10 ^e	15.23 ± 0.06 ^f
Gram (-): <i>Salmonella</i> sp.	M-H	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	M-E	9.50 ± 0.10 ^d	9.00 ± 0.10 ^c	8.47 ± 0.06 ^b
	M-A	10.90 ± 0.10 ^f	9.40 ± 0.10 ^d	8.93 ± 0.06 ^c
	S-H	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	S-E	11.97 ± 0.06 ⁱ	10.50 ± 0.10 ^e	11.50 ± 0.10 ^h
	S-A	11.93 ± 0.06 ⁱ	11.00 ± 0.10 ^g	11.40 ± 0.10 ^h

Letras iguales por cada cepa bacteriana evaluada indican que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

M: Maceración, S: Soxhlet, H: hexano, E: etanol, A: agua, C+: control positivo (gentamicina).

mediante un método Soxhlet tienen mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (-), (zona de inhibición: ~9 mm), sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son mejores a lo reportado en la literatura, como se puede ver al inicio de este apartado, aunque, cabe mencionar que comparando los resultados con el control positivo empleado no se iguala su potencial, ya que la zona de inhibición fue de 24 ± 0.01 mm y 21 ± 0.01 mm, para la bacteria Gram (+) y Gram (-), respectivamente.

Silva y Fernandes (2010), mencionan que algunos fitoquímicos presentan actividad antimicrobiana y que dependiendo de su estructura es su mecanismo de acción, por ejemplo, los flavonoides se unen a la pared celular, las flavonas específicamente forman un complejo con la pared celular o pueden inactivar enzimas, y los taninos forman enlaces con las proteínas, se unen a la pared celular, inhiben enzimas, compiten con el sustrato por el sitio activo, forman complejos con la pared celular, rompen la membrana o forman complejos con iones metálicos. En este sentido, los mecanismos de resistencia están involucrados con la desintegración de la membrana citoplasmática, el transporte activo, el flujo de electrones y la desestabilización de la fuerza motriz del protón. Sin embargo, no todos los mecanismos de acción se llevan a cabo en sitios específicos y algunos de estos pueden verse afectados a causa de otras interacciones químicas. Asimismo, los fitoquímicos hidrofóbicos debido a que pueden interactuar con los lípidos de la membrana con mayor facilidad ocasionan desestabilizar la estructura celular, haciéndola más permeable, es decir, la estructura hidrocarbonada cíclica de estas moléculas puede interactuar directamente con las ATPasas y enzimas que se localizan en membrana citoplasmática (Burt, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2018; Klyuchko, 2020). Por otra parte, Carson *et al.* (2002) reportan que para las bacterias *E. coli* y *S. aureus* cuando se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento son

generalmente menos sensibles a tener daños en su estructura celular ocasionados por los diferentes mecanismos de acción de los fitoquímicos que cuando se encuentran en la fase exponencial, lo que sugiere que la principal función de los fitoquímicos no es causar daño grave a la pared celular, y por el contrario predomina un proceso autolítico por parte de enzimas celulares de la bacteria, lo que puede inducir lisis celular y un debilitamiento de la membrana como lo menciona Khameneh *et al.* (2019). Asimismo, las bacterias pueden liberar potasio cuando están expuestas a sustancias tóxicas para ellas como los fitoquímicos y de esta manera les permite retardar el daño a su estructura celular; sin embargo, la presencia de flavonas y flavonoles son los causantes de inhibir este proceso e inducir daño celular (Meghashri y Gopal, 2012).

CONCLUSIÓN

En general, la fracción Ho presentó mayor contenido de proteínas (32.67 ± 0.25), pentosanos (9.87 ± 0.06) y holo-celulosa (65.34 ± 0.06) en comparación a las fracciones B y Ho+B, asimismo, sus extractos acuosos obtenidos por ambos métodos de extracción presentaron mayor contenido de fitoquímicos con propiedades bacteriostáticas (fenoles totales, flavonoides y saponinas), siendo los extractos acuosos obtenidos por Soxhlet los que presentaron mayor inhibición contra las bacterias patógenas para humanos (*S. aureus* (halo de inhibición: 18.40 ± 0.10 mm) y *Salmonella* sp. (halo de inhibición: 11.93 ± 0.06 mm)), lo que sugiere que esta fracción tiene potencial biotecnológico para emplearse como materia prima para la producción de xilooligosacáridos, enzimas o compuestos bioactivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la UPPachuca y a CONACyT por su apoyo

REFERENCIAS

- Adelakun, K. M., Kehinde, A. S., Amali, R. P., Ogundiwin, D. I. y Omotayo, O. L. 2016. Nutritional and phytochemical quality of some tropical aquatic plants. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*. 4: 1-4.
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A. y Lakhssassi, N. A. 2019. Comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*. 9: 258.
- Anusiya, G., Bharathi, S., Mukesh Praveen, K. y Sainandhini, G. 2020. Extraction and molecular characterization of biological compounds from water hyacinth. *Journal of Medicinal Plants*. 8: 14-19.
- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Azwanida, N.N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatical Plants*. 4: 2167-0412.
- Baral, B., Vaidya, G. S. y Bhattarai, N. 2011. Bioactivity and biochemical analysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Botanica Orientalis: Journal of Plant Science*. 8: 33-39.

- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiol.* 94: 233-253.
- Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., Arbizu, C., Roca, W. y Cisneros-Zevallos, L. 2006. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 86: 1481-1488.
- Carson, C.F., Mee, B.J. y Riley, T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents, and chemotherapy.* 46: 1914-1920.
- Das A., Ghosh P., Paul T., Ghosh U., Pati B. R. y Mondal K.C. 2016. Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *3 Biotech.* 6: 1-9.
- Fareed M.F., Haroon A.M. y Rabeh S.A. 2008. Antimicrobial activity of some macrophytes from lake Manzalah (Egypt). *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 11: 2454-2463.
- Gabriel, A.F., Igwemmar, N.C., Sadam, A.A. y Babalola, S.A. 2018. Comparative studies of the phytochemical and nutritional analysis of water hyacinths [*Eichhornia crassipes*] stem and leaf. *Direct Research Journal of Health and Pharmacology.* 6: 12-18.
- Gbadamosi, I.T. y Kalejaye, A.O. 2017. Comparison of the antioxidant activity, phytochemical and nutritional contents of two antihypertensive ethnomedicinal plants. *Ife Journal of Science.* 19: 147-158.
- Hamid, H.H. 2013. Photochemical, antioxidant and antibacterial activities of some extracts of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) leaves. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Research.* 4: 1847-1851.
- Joshi, M. y Kaur, S. 2013. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Calotropis procera*, *Eichhornia crassipes* and *Datura innoxia* leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 6: 25-28.
- Kandukuri, V., Jakku, V.G., Aruri, S. y Singara, C. 2009. Biomolecular and phytochemical analyses of three aquatic angiosperms. *African Journal of Microbiology Research.* 3: 418-421.
- Khalid, S., Shaheen, S., Hussain, K., Shahid, M.N. y Sarwar, S. 2020. Pharmacological analysis of obnoxious water weed: *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms. *Journal of Animal and Plant Sciences.* 30: 1465-1475.
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V. y Bazzaz, B. S. F. 2019. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control.* 8: 118.
- Klyuchko, O. M. 2020. Aromatic hydrocarbons of arthropodae species: mechanisms of action on biological membranes and perspectives of biomedical application. *Biotechnologia Acta.* 13: 12-31.
- Kriticos, D.J. y Brunel, S. 2016. Assessing and managing the current and future pest risk from water hyacinth, (*Eichhornia crassipes*), an invasive aquatic plant threatening the environment and water security. *Plos One*, 11: 6-18.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T. y Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry.* 84: 329-339.
- Lara-Serrano J.S., Rutiaga-Quiñones O.M., López-Miranda J., Fileto-Pérez H.A., Pedraza-Bucio F.E., Rico-Cerda J.L. y Rutiaga-Quiñones J.G. 2016. Physicochemical characterization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). *BioResources.* 11: 7214-7223.
- Lenora, L.M. y Senthilkumar, N. Insecticidal potential of aquatic alien weed, *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms on *Tobacco Caterpillar, Spodoptera litura* (F.). 2017. *Asian Journal of Plant Science and Research.* 7: 1-6.
- Liu, C.C., Zhao, G.L., Li, Y.N., Ding, Z.P., Liu, Q.G. y Li, J.L. 2017. Contribution of phenolics and flavonoids to anti-oxidant activity and of ethanol extract from *Eichhornia crassipes*. *Advanced Materials Research.* 156: 1372-1377.
- Lozano, M., Ticona, E., Carrasco, C., Flores, Y. y Almanza, G.R. 2012. Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* willd. *Revista Boliviana de Química.* 29: 131-138.
- Meghashri, S., y Gopal, S. 2012. Leucasin - induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Phytomedicine.* 4: 150-154.
- Mohamed, W.A., Mansour, M.M. y Salem, M.Z. 2019. *Lemna gibba* and *Eichhornia crassipes* extracts: Clean alternatives for deacidification, antioxidation and fungicidal treatment of historical paper. *Journal of Cleaner Production.* 219: 846-855.
- Mohan, A., Munusamy, C., Yee-Tan, C., Muthuvelu, S., Hashim, R., Su-Lin, C., Whong, M. K., Khairuddin, N. A., Podin, Y., Lau, P. S. T., Chun-Ern Ng, D. y Mong-Ooi-How, O. 2019. Invasive *Salmonella* infections among children in Bintulu, Sarawak, Malaysian Borneo: a 6-year retrospective review. *B.M.C. Infectious disease.* 19: 1-11.
- Prabakaran, A.S. y Mani, N. 2017. Analysis of bioactive compounds and elemental analysis in *Eichhornia crassipes* leaf. *World Journal of Pharmaceutical research.* 6: 1083-1092.
- Purbowatiningrum, R. S., Hapsari, M., Rafi'ah, F.H. y Haq, M.S. 2017. Synthesis of furfural from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) In *I.O.P. Conference Series: Materials Science and Engineering.* 172: 1-6.
- Reddy, A.M., Pratt, P.D. Hopper, J.V., Cibils-Stewart, X., Cabrera-Walsh, G. y Mac-Kay, F. 2019. Variation in cool temperature performance between populations of *Neochetina eichhorniae* (Coleoptera: Curculionidae) and implications for the biological control of water hyacinth, *Eichhornia crassipes*, in a temperate climate. *Biological Control.* 128: 85-93.
- Rorong, J.A., Sudiarso, S., Prasetya, B., Polii-Mandang, J. y Suryanto, E. 2012. Phytochemical analysis of eceng gondok (*Eichhornia crassipes* solms) of agricultural waste as biosensitizer for ferri photoreduction. *Journal of Agricultural Science.* 34: 152-160.
- Sarker S.D., Latif Z. y Gray A. 2006. Extraction of plant secondary metabolites. In: *Natural Products Isolation.* (2da Ed.) Humana Press Inc., pp. 1-26. Totowa, New Jersey.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. y Verdian-rizi, M. 2007. Spectrophotometric determination of total alkaloids in *Peganum harmala* L. using bromocresol green. *Research Journal of Phytochemistry.* 1: 79-82.
- Shivae, A., Rajabi, S., Farahani, H. E. y Fooladi, A. A. I. 2021. Effect of sub-lethal doses of nisin on *Staphylococcus aureus* toxin production and biofilm formation. *Toxicon.* 197: 1-5.

- Silva, N.C.C. y Fernandes, J.A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous Animals and Toxins including tropical diseases*. 16: 402-413.
- Singleton, V.L. y Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Soares e Silva, L., Santos da Silva L., Brumano L., Stringheta P.C., de Oliveira-Pinto, M.A., MoreiraDias, L.O., de Sá Martins-Muller, C., Scio, E., Luis-Fabri, R., Castro H.C. y da Pena-Henriques do Amaral, M. 2012. Preparation of dry extract of *Mikania glomerata* sprengel (guaco) and determination of its coumarin levels by spectrophotometry and HPLC-UV. *Molecules*. 17: 10344-10354.
- Su, W., Sun, Q., Xia, M., Wen, Z. y Yao, Z. 2018. The resource utilization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* [Mart.] solms) and its challenges. *Resources*. 7: 46-54.
- Surendraraj, A., Farvin, K. H. S. y Anandan, R. 2013. Antioxidant potential of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): In vitro antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 22: 11-26.
- T 203 cm-09. 2015. Alpha-, Beta-, and Gamma-cellulose in the pulp. T.A.P.P.I. Standards
- T 211 om. 1993. Ash in wood and pulp. T.A.P.P.I. Standards
- T 212 cm-12. 2015. One percent sodium hydroxide solubility of wood and pulp. T.A.P.P.I. Standards
- T 223 cm-84. 1984. Pentosans in wood and pulp. T.A.P.P.I. Standards
- Tovar-Jiménez, X., Arana-Cuenca, A., Téllez-Jurado, A., Abreu-Corona, A. y Muro-Urista, C.R. 2012. Traditional methods for whey protein isolation and concentration: effects on nutritional properties and biological activity. *Journal Mexican Chemistry Society*. 56, 369-377.
- Tovar-Jiménez, X., Favela-Torres, E., Volke-Sepúlveda, T.L., Escalante-Espinosa, E., Díaz-Ramírez, I.J., Córdova-López, J.A. y Téllez-Jurado, A. 2019. Influencia de la zona geográfica y fracción del lirio acuático en su composición química. *Ingeniería agrícola y biosistemas*, 11: 39-52.
- Tyagi, T., Katara, A., Parashar, P. y Agarwal, M. 2017. An important ethanomedicinal invasive weed *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms and *Pistia stratiotes* (L.): Phenolic profiling and antioxidant activity. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 10: 53-58.
- Vasconcelos, N. G., Croda, J. y Simionatto, S. 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial pathogenesis*. 120: 198-203.
- Yan, S.H., Song, W. y Guo, J.Y. 2017. Advances in management and utilization of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in aquatic ecosystems – a review. *Critical reviews in biotechnology*. 37: 218-228.
- Yuan T.Q. y Sun R.C. 2010. Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose. Cereal straw as a resource for sustainable Biomaterials and Biofuels, Vol. 1, Elsevier, Oxford, UK.

Antibacterial and antimycobacterial activity of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exoskeleton and cephalothorax by-products extracts: fatty acids profile of the active hexanic shrimp cephalothorax extract

Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de los subproductos exoesqueleto y cefalotórax del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*): perfil de ácidos grasos del extracto activo hexánico del cefalotórax del camarón blanco

López-Saiz CM¹, Coronado-Aceves EW², Tavera-Hernández R³, Espitia-Pinzón CI², Jiménez-Estrada M³, Morán-Corrales PG⁴, Hernández-Zazueta MS^{1*}

¹ Department of Research and Postgraduate Studies in Food, University of Sonora. Blvd. Luis Encinas and Rosales, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.

² Biomedical Research Institute. National Autonomous University of México. CP 04510. México City, México.

³ Institute of Chemistry. National Autonomous University of México. CP 04510. México City, México.

⁴ Department of Chemical Engineering and Metallurgy. University of Sonora. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antibacterial and antimycobacterial potential of the by-products of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The following extracts were obtained: exoskeleton hexanic, methanolic and aqueous extracts (ExHex, ExMe, ExAc); and cephalothorax hexanic, acetonic and methanolic extracts (CeHex, CeAce, CeMe). Antibacterial effect was determined by the broth microdilution method against Gram-positive bacteria: *Enterococcus faecalis* American Type Culture Collection (ATCC) 51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, and *Staphylococcus epidermidis*; Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, and *Salmonella typhimurium*; and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) Danish strain. CeHex resulted active against all Gram-positive and Gram-negative bacteria (MIC₅₀ = 400 µg mL⁻¹) and against *M. bovis* BCG (MIC₁₀₀ = 250 µg mL⁻¹). Gas chromatography (GC) of CeHex identified oleic, linoleic, palmitic, stearic, behenic, palmitoleic and linolenic fatty acids. The strong antibacterial activity of CeHex and the identification of its main chemical constituents justify further studies on the clinical applications of this marine by-product.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, antimicrobial, *Mycobacterium*, by-products, fatty acids

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antibacteriano y antimicobacteriano de los sub-productos del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Fueron obtenidos los siguientes extractos: extracto hexánico, metanólico y acuoso del exoesqueleto (ExHex, ExMe, ExAc); y extracto hexánico, acetónico y metanólico del cefalotórax (CeHex, CeAce, CeMe). El efecto antibacteriano fue evaluado mediante el método de microdilución en caldo contra las bacterias

Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* American Type Culture Collection (ATCC) 51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, y *Staphylococcus epidermidis*; bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, y *Salmonella typhimurium*; y *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) cepa Danesa. CeHex resultó activo contra todas las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (MIC₅₀ = 400 µg mL⁻¹) y contra *M. bovis* BCG (MIC₁₀₀ = 250 µg mL⁻¹). Mediante cromatografía de gases (GC) de CeHex se identificaron los ácidos grasos: oleico, linoleico, palmítico, esteárico, behénico, palmitoleico y linolénico. La fuerte actividad antibacteriana de CeHex y la identificación de sus principales componentes químicos justifican estudios posteriores en las aplicaciones clínicas de este sub-producto marino.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, antimicrobiano, *Mycobacterium*, sub-productos, ácidos grasos

INTRODUCTION

Mexico's shrimp farming sector harvest a total of 177,000 tonnes in 2021 according to the National Commission of Aquaculture and Fisheries (CONAPESCA). Mexico has around 900 shrimp farms, 45 hatcheries and over 40 shrimp processing plants. Sinaloa is the main producer of farmed shrimp (40.3 %), followed by Sonora (39.7 %) and Nayarit (7.5 %) (TheFishSite, 2021).

Only 65% of the crustacean is used for human consumption, the rest corresponds to the exoskeleton and cephalothorax (Núñez-Gastélum *et al.*, 2011). The waste is almost completely discarded, except that only a little is processed as an excellent animal feed supplement (Nwana *et al.*, 2004).

Seafood by-products are valuable natural resources that show range of functionalities and hence potential materials for biomedical and nutraceutical industries (Se-

*Autor para correspondencia: Martín Samuel Hernández Sazueta
Correo electrónico: martinsamuel.hernandez@gmail.com

Recibido: 23 de diciembre de 2021

Aceptado: 7 de marzo de 2022

nevirathne and Kim, 2012; Hernández-Zazueta *et al.*, 2021a; Hernández-Zazueta *et al.*, 2021b).

Shrimp industry wastes have attracted attention due to the presence of valuable bioactive compounds as proteins, lipids, pigments (carotenoids), chitin/chitosan, oligosaccharides, vitamins, etc. (Sachindra *et al.*, 2006; Nirmal *et al.*, 2020). Bioactive evaluations reported include antimicrobial activity (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae* and *Bacillus subtilis*; *Lactobacillus helveticus*, *L. innocua*, *S. aureus*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, and *P. fluorescens*) (Vilar *et al.*, 2016; Djellouli *et al.*, 2020), antioxidant, ACE (Angiotensin I converting enzyme) inhibitory activity, and antiinflammatory (Nirmal *et al.*, 2020).

Natural products take the leading place in drug discovery of antimicrobial agents highlighting the fact that approximately 70% of antibiotics clinically used for treatment of infectious diseases are derived from nature (Brown *et al.*, 2014).

To the best of our knowledge, this is the first report of these *L. vannamei* by-products extracts activity against this set of clinical relevance bacteria (*E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*; and *M. bovis* BCG).

MATERIALS AND METHODS

Shrimp material

A sample of white shrimp (*L. vannamei*) was obtained in the central-western region of the state of Sonora, in the town of Bahía de Kino (28° 49'22" N 111° 56'27" W). The raw material was separated into exoskeleton and cephalothorax, ground (Osterizer, Oster, USA) and stored in polyethylene bags at -18 °C until use.

Preparation of shrimp extracts

Twenty g of shrimp material were homogenized with 60 mL of solvent (proportion 1:3 weight/volume) (n-hexane, acetone, metanol or water, Químicos Fermont, Mexico) in a blender (Osterizer, Oster, USA) at high speed for 1 min and the resulting mixture was kept in an Erlenmeyer flask at room temperature for 24 h in darkness. Solids were filtered out (filter paper Whatman no. 1), the extracts concentrated by evaporation under reduced pressure at 30 °C in a rotary evaporator (HS-20055-N, Hahn vapor Hahnshin Scientific Co., Republic of Korea), and dried under N₂ stream (López-Saiz *et al.*, 2014; Osuna-Ruiz *et al.*, 2016). The following extracts were obtained: exoskeleton hexanic, methanolic and aqueous extracts (ExHex, ExMe, ExAc); cephalothorax hexanic extract, acetic and methanolic extracts (CeHex, CeAce, CeMe).

Antibacterial Activity

Bacterial strains

Bacterial strains used in this study: Gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis* American Type Culture Collection (ATCC) 51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, and *Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudo-*

monas aeruginosa ATCC 10145, and *Salmonella typhimurium*), obtained from the ceparium of the Department of Chemical Biological Sciences of the University of Sonora. Before testing, all bacterial strains were maintained frozen at -70 °C in 10 % glycerol broth.

Preparation of working solution

Each organic extract was dissolved in 100 % dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) (20 mg mL⁻¹) and maintained at room temperature for 1 h to assure their sterilization (Molina-Salinas *et al.*, 2006). These extracts were diluted with fresh Mueller Hinton broth (BD DIFCO, Sweden) to their final concentrations of 50, 100, 200 and 400 µg mL⁻¹.

Preparation of inoculum

Bacterial colonies grown on Mueller Hinton agar (MCD Lab, México) for 18 - 24 h (log phase of growth) were transferred to a sterile vial containing 15 mL of sterile 0.85 % saline solution. The bacterial suspension was disaggregated by agitation using a Genie II vortex, speed 3, for 1 minute, and left to stand for 10 min at room temperature. The supernatant was then adjusted to the optical density of OD_{630 nm} = ~0.095, a turbidity matching the 0.5 McFarland standard (1.5 x 10⁸ colony forming units CFU mL⁻¹).

Antibacterial assay

In vitro antibacterial studies were carried out by the broth microdilution method as described previously (Velazquez *et al.*, 2007; Navarro-Navarro *et al.*, 2013). Briefly, 15 µL (2.25 x 10⁶ CFU) of the inoculum (Velazquez *et al.*, 2007) were inoculated into each well of a flat 96-well microplate (Costar, Corning, USA), containing 200 µL of different concentrations of the organic extracts (50–400 µg mL⁻¹) in Mueller Hinton Broth (BD DIFCO, Sweden). Additionally, each antibacterial test included wells containing the culture media plus DMSO (2 %), in order to obtain a control of the solvent's antibacterial effect. Gentamicin (12 µg mL⁻¹) (AMSA, México) was used as positive control of bacterial growth inhibition. Bacterial cultures were incubated at 37 °C for 48 h. Plates were read at 630 nm in an enzyme-linked immunoassay (ELISA) microplate reader (Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, USA) at 6, 12, 24, and 48 h. The optical density (OD_{630 nm}) was corrected by subtracting the OD_{630 nm} from wells with extracts alone in sterile broth. The minimal inhibitory concentration was defined as the lowest extracts concentrations that inhibited at least 50 % (MIC₅₀) or 90 % (MIC₉₀) of the bacterial growth after incubation at 37 °C for 24 h. MICs were determined using the following criteria (Baizman *et al.*, 2000; Velazquez *et al.*, 2007):

$$\text{MIC}_{50} : (\text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ untreated bacteria} - \text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ test concentration}) / (\text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ untreated bacteria}) \times 100 \geq 50 \%$$

$$\text{MIC}_{90} : (\text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ untreated bacteria} - \text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ test concentration}) / (\text{OD}_{630 \text{ nm}} \text{ untreated bacteria}) \times 100 \geq 90 \%$$

Antimycobacterial Activity of Shrimp Extracts

Mycobacterial strain

Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) Danish strain was obtained from the ceparium of

the BSL3 laboratory of the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico.

M. bovis BCG inoculum preparation

M. bovis BCG strain was cultivated in 50 mL of Middlebrook 7H9 broth (Becton Dickinson, USA) supplemented with 0.2 % (v/v) glycerol, and 10 % (v/v) ADC (albumin, dextrose, catalase enrichment) (Becton Dickinson, USA) (MDB 7H9) to which 0.02 % (v/v) tyloxapol (Sigma-Aldrich, USA) was added. Bacteria was incubated at 37 °C until an OD_{600 nm} of 0.39 was reached (equivalent to 1 McFarland unit). Working bacteria solution was prepared by a 1:25 dilution in MDB 7H9 (Peñuelas-Urquidez *et al.*, 2013; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2020).

Resazurin microtiter assay (REMA) to evaluate inhibitory activity against M. bovis BCG

This assay was adapted from Collins and Franzblau (1997). In 96-well polystyrene flat bottom plates, 200 µL of sterile distilled water were added to the perimetral wells, and 100 µL of MDB 7H9 broth were added to the remaining wells. Working solutions of extracts (2000 µg mL⁻¹) were distributed into the first well of each row, and 2-fold dilution series were made using the following four wells. 100 µL of inoculum was added to each test well. The final concentrations in-test ranged from 31.25 to 500 µg mL⁻¹. The controls of this experiment were: rifampicin (Sigma-Aldrich, USA) (concentrations of 16–9.7x10⁻⁴ µg mL⁻¹), MDB 7H9, MDB 7H9 with bacteria, extracts (without bacteria), 2.5 % DMSO, and 2.5 % DMSO with bacteria. The microplate was sealed with parafilm and incubated for 6 days at 37 °C. Further, 30 µL of 0.01 % resazurin sodium salt (weight/volume) (Sigma-Aldrich, USA) (Palomino *et al.*, 2002) were added to each well and plates were reincubated for 48 h. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the minimum concentration of crude extract that prevented the color shift from resazurin (blue) to resorufin (pink). Experiments were performed in triplicate.

Determination of the fatty acid profile

The fatty acid profile was determined as fatty acid methyl esters (FAMES), which were prepared adding to 10 mg of the CeHex, 200 µL of benzene and 200 µL of the derivatizing reagent Meth-Prep II (GraceTM AlltechTM). This reagent is a 0.2 N methanolic solution of (m-trifluoromethylphenyl) trimethylammonium hydroxide. The transesterification reaction was carried out at room temperature for 30 minutes to obtain the FAMES mixture. 1 µL of the FAMES mixture was injected to the gas chromatograph (Agilent 6890) equipped with a flame ionization detector (FID), and the AT-FAME column (30 m x 0.25 mm). The analytical conditions were: injection 1 mL, injector temperature 250 °C, detector temperature 250 °C. The temperature gradient in the column oven starts at 180 °C for 15 min, followed by 10 °C / min increments up to 230 °C. The FAME standards retention times were used to identify the chromatographic peaks of the samples. Fatty acid content was calculated, based on the normalized peak area of detected FAMES.

Statistical analysis

Antibacterial results were expressed as mean ± standard deviation of three independent experiments. Statistical analysis performed was one-way analysis of variance (Tukey) and the graphs of bacterial growth kinetics were made with GraphPad Prism © Version 5.01 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Antibacterial activity

CeHex was the most potent extract, active against all Gram-positive and Gram-negative bacteria tested with a MIC₅₀ = 400 µg mL⁻¹; subsequently, CeAce was active against *E. faecalis*, *E. coli* and *K. pneumoniae* (MIC₅₀ = 100, 400 and 400 µg mL⁻¹, respectively). While CeMe resulted inactive. It is clear that the shrimp cephalothorax extracts were the most potent antibacterial samples tested. Non-polar or low polarity compounds may be the main responsible of the antibacterial activity described in CeHex. Despite antibacterials are collectively classified as large and polar compounds with relatively low lipophilicity (Mugumbate *et al.*, 2015), in this research increasing polarity of solvents diminished the antibacterial activity. Solvent polarity is usually the most influential factor on the yield of the extraction (Bayona *et al.*, 2018), has a great impact on selectivity, and influence directly on the solutes extracted, related to the chemical structure of the compounds (Lefebvre *et al.*, 2020). Recent research described that the shrimp oil extracted from cephalothorax (with a 1:1 hexane/isopropanol mixture) possesses an important amount of cholesterol (89.1 ± 0.6 mg/g) (Raju *et al.*, 2021), then it is possible that cholesterol is also present and abundant in the acetonic and methanolic extracts, affecting the antibacterial activity.

All exoskeleton extracts were inactive except for ExMe (MIC₅₀ = 50 µg/mL⁻¹), active against *E. faecalis*, which was the most susceptible bacteria to shrimp extracts, followed by *E. coli* and *K. pneumoniae* (Figure 1, Table 1).

Regarding *L. vannamei* waste, various studies have reported the inhibitory and bactericidal activity of chitosan prepared from shell waste against Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria (Vilar *et al.*, 2016); moreover, its antibacterial activity against *Xanthomonas sp.* isolated from leaves affected with citrus canker was proven (Mohanasrinivasan *et al.*, 2014).

A very interesting review about the utilization of seafood processing by-products was published describing peptides, oligosaccharides, fatty acids, enzymes, oils, and biopolymers isolated from fishes, crustacean shells, and shellfish, with many biological activities as antibacterial, antiviral, and anticancer (Senevirathne and Kim, 2012).

Moreover, marine sponges, produces interesting antibacterial compounds, in example: *Arenosclera brasiliensis* produces alkaloids active against resistant *S. aureus* and *P. aeruginosa* (Torres *et al.*, 2002); *Cribrochalina sp.* produces alkaloids (cribrostatin 3) active against *Neisseria gonorrhoeae* (Pettit *et al.*, 2000), just to mention a few (Laport *et al.*, 2009).

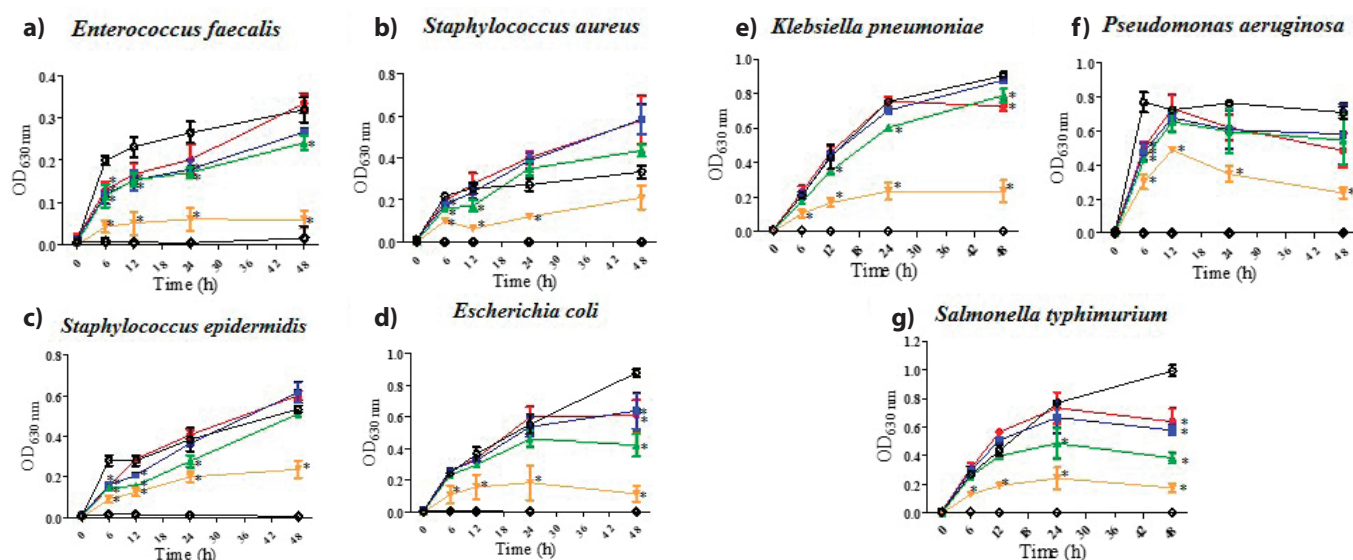


Figure 1. Antibacterial activity of shrimp cephalothorax hexanic extract, CeHex, evaluated at 50–400 µg mL⁻¹ (●, 50 µg mL⁻¹; ■, 100 µg mL⁻¹; ▲, 200 µg mL⁻¹; ▼, 400 µg mL⁻¹; ◊, gentamicin 12 µg mL⁻¹; ○, bacteria). All values represent mean of triplicate determinations ± SD. Significant differences (*p* < 0.05) from bacterial growth control are marked with an asterisk.

Figura 1. Actividad antibacteriana del extracto hexánico del cefalotórax de camarón, CeHex, evaluada a 50–400 µg mL⁻¹ (●, 50 µg mL⁻¹; ■, 100 µg mL⁻¹; ▲, 200 µg mL⁻¹; ▼, 400 µg mL⁻¹; ◊, gentamicina 12 µg mL⁻¹; ○, bacteria). Todos los valores representan el promedio de un triplicado ± Desviación Estándar. Diferencias significativas (*p* < 0.05) respecto al control de crecimiento bacteriano son marcados con un asterisco.

Table 1. Growth-inhibitory activity of shrimp exoskeleton, muscle, and head extracts against different Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Tabla 1. Actividad inhibitoria del crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas por extractos de exoesqueleto y cefalotórax de camarón.

Strains	Crude shrimp extract ^a												
	ExHex		ExMe		ExAc		CeHex		CeAce		CeMe		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
Gram-positive bacteria	<i>Enterococcus faecalis</i>	>400	>400	50	>400	>400	>400	400	>400	100	>400	>400	>400
	<i>Staphylococcus aureus</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	400	>400	>400	>400
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	400	>400	>400	>400
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400
	<i>Salmonella typhimurium</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400

^aConcentration in µg mL⁻¹

ExHex: Exoskeleton hexanic extract; ExMe: Exoskeleton methanolic extract; ExAc: Exoskeleton aqueous extract; CeHex: cephalothorax hexanic extract; CeAce: cephalothorax acetic extract; CeMe: cephalothorax methanolic extract.

Antimycobacterial activity

M. bovis BCG was used as an alternative to *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv as it owns similar profiles of antibiotic susceptibility and offers a safer option for screening anti-tubercular compounds in a high-throughput format (Taneja and Tyagi, 2007; Altaf et al., 2010).

CeHex was the most active extract with a MIC₁₀₀ of 250 µg mL⁻¹, followed by CeAce with a MIC₁₀₀ of 500 µg mL⁻¹. The rest of the extracts (CeMe; ExHex, ExMe, and ExAc) were inactive against *M. bovis* BCG (Figure 2).

These results are in accordance to previous reports where non-polar extracts are recommended to find antimycobacterial compounds (Coronado-Aceves et al., 2016).

Previous studies have considered that an extract is active against mycobacteria if MIC is ≤250 µg mL⁻¹ (as exerted by CeHex); however, it is also relevant to consider toxicological studies (Coronado-Aceves et al., 2016; Jurno et al., 2019).

Chitosan obtained by deacetylation of chitin extracted from shrimp shell wastes has been used for the encapsulation of panchovillin, isolated from *Erythrina schliebenii*, and its antimycobacterial activity was demonstrated over *Mycobacterium indicus pranii* using *Galleria mellonella* larvae as an *in vivo* infection model (Rwegasila et al., 2016).

Another study investigated two edible marine algae, *Ulva lactuca* and *Ulva intestinalis*, finding that both extracts inhibit the mycobacterial biofilm development (Mukherjee et al., 2021).

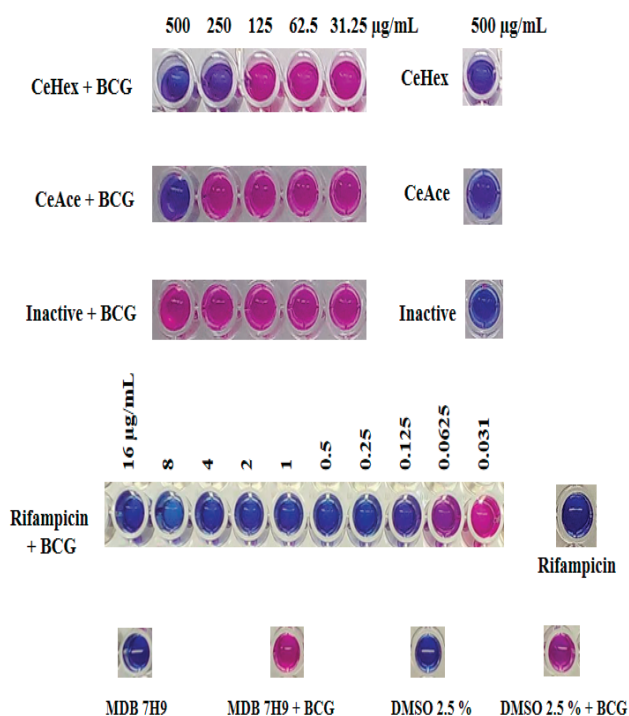


Figure 2. Antimycobacterial activity of shrimp extracts. CeHex: shrimp cephalothorax hexanic extract, $MIC_{100}=250 \mu\text{g mL}^{-1}$; CeAce: shrimp cephalothorax acetonic extract, $MIC_{100}=500 \mu\text{g mL}^{-1}$; 'Inactive' represents CeMe, ExHex, ExMe, and ExAc; BCG: *M. bovis* BCG.

Figure 2. Actividad antimicrobiana de extractos de camarón. CeHex: extracto hexánico del cefalotórax de camarón, $MIC_{100}=250 \mu\text{g mL}^{-1}$; CeAce: extracto acetónico del cefalotórax de camarón, $MIC_{100}=500 \mu\text{g mL}^{-1}$; 'Inactive' representa a CeMe; ExHex, ExMe, y ExAc; BCG: *M. bovis* BCG.

Finally, remarkable reviews have been published describing more than 250 antimycobacterial metabolites from marine natural products (Daleto *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

Determination of the fatty acid profile

Some investigations have been carried out to elucidate the content of primary and secondary metabolites present in shrimp, as well as its biological activity of extracts of different polarity and/or fractions of the muscle, exoskeleton, head, and tail (Núñez-Gastélum *et al.*, 2011; López-Saiz *et al.*, 2014).

Shrimp muscle is reported to have a high content of high-quality protein and a low proportion of fatty acids (López-Saiz *et al.*, 2016; AlFaris *et al.*, 2021) and consequently, it is the part of the shrimp with the highest commercial value. The exoskeleton, head, and tail are often discarded or transformed into feed for aquaculture or supplemented as feed for animals (Nwanna *et al.*, 2004). Various bioactive compounds have been described from all parts of the shrimp (Mandeville *et al.*, 1992; Heu *et al.*, 2003; Sachindra *et al.*, 2006; López-Saiz *et al.*, 2014; Bharathi *et al.*, 2019), which is why the waste generated from this crustacean has attracted attention in recent years. It has been possible to separate chitin, proteins,

and lipids from shrimp waste (Núñez-Gastélum *et al.*, 2011) and it has been reported that pigments such as astaxanthins and fatty acids are found within the lipid fraction (Armenta *et al.*, 2002; Kandra *et al.*, 2012; López-Cervantes *et al.*, 2010).

The presence of polyunsaturated fatty acids has been described in shrimp oil obtained from cephalothorax, mainly EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid) (Núñez-Gastélum *et al.*, 2011; Takeungwongtrakul *et al.*, 2012; Gulzar and Benjakul, 2018). These fatty acids belong to the group of ω -3 and therefore, they are widely valued for their nutraceutical and medicinal applications.

Oleic acid has been detected within the most abundant fatty acids extracted from shrimp cephalothorax (Takeungwongtrakul *et al.*, 2012).

In order to know a more complete profile of fatty acids present in CeHex, derivatization was carried out to form the methyl esters of the fatty acids and they were analyzed by gas chromatography (GC) (Figure 3). Fatty acid methyl esters were identified with the use of standards.

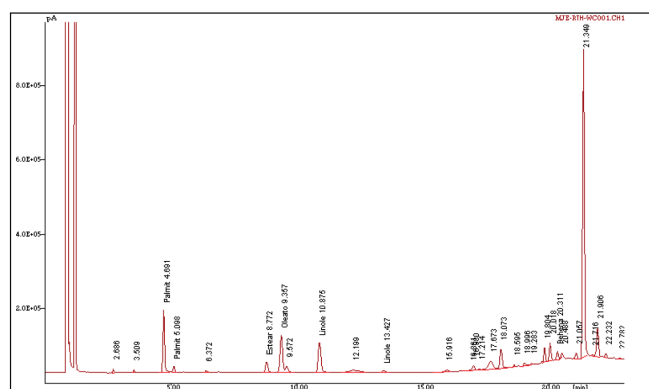


Figure 3. Chromatogram of fatty acid methyl esters of CeHex.

Figure 3. Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos de CeHex.

Table 2 shows the retention times of the detected peaks, the area percentage, and the methyl ester to which it corresponds according to its retention time. The fatty acid methyl esters that were identified in the highest proportion are oleate, linoleate, and palmitate (Figure 4). Other fatty acid methyl esters that were identified in lower proportions are stearate, palmitoleate, linolenate, and behenate (Figure 4). In another investigation where shrimp head oil was analyzed by gas chromatography, 14 fatty acid methyl esters were identified, of which it is confirmed that the main fatty acids are oleic, in a similar proportion to linoleic, followed by palmitoleic.

Table 2. Identification of fatty acid methyl esters.

Tabla 2. Identificación de ésteres metílicos de ácidos grasos.

# peak	Methyl ester	Fatty acid	Retention time (min)	% Area
3	Methyl palmitate	C16:0	4.691	25.764
4	Methyl palmitoleate	C16:1n7	5.098	2.866
6	Methyl stearate	C18:0	8.772	8.338
7	Methyl oleate	C18:1n9	9.357	29.294
9	Methyl linoleate	C18:2n6	10.875	27.896
11	Methyl linolenate	C18:3n3	13.427	1.806
23	Methyl behenate	C22:0	20.311	4.036

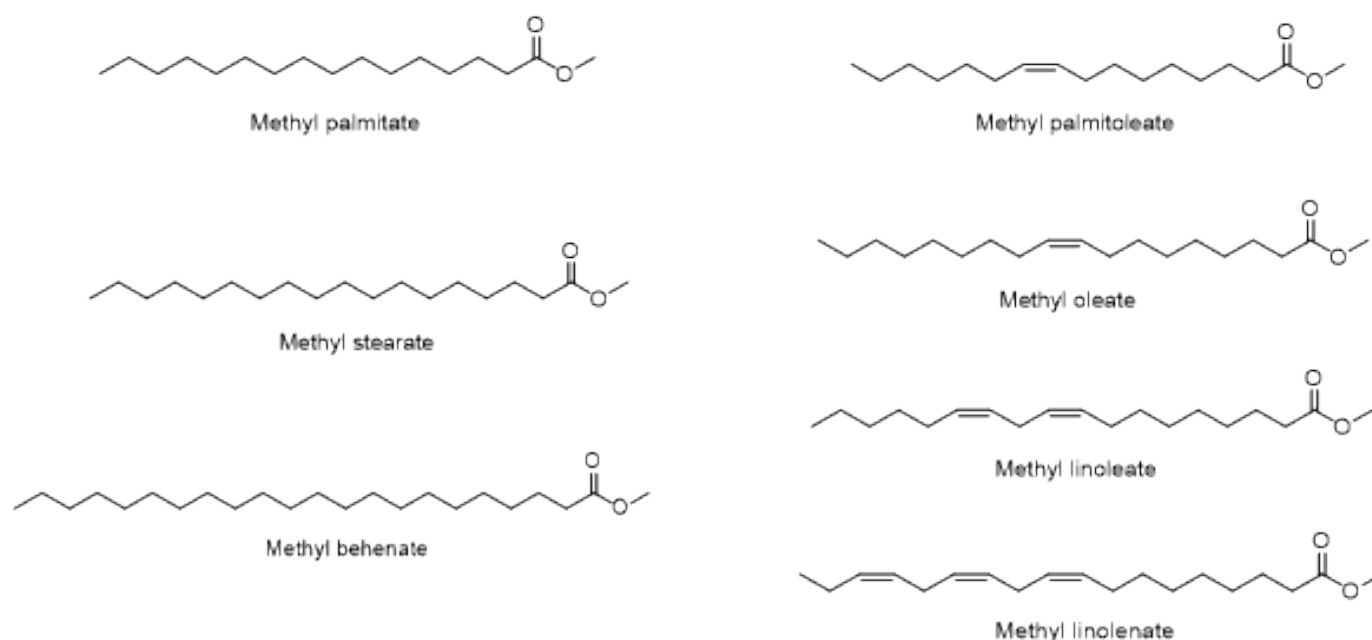


Figure 4. Structures of fatty acid methyl esters identified by GC.

Figura 4. Estructuras de los ésteres metílicos de ácidos grasos identificados mediante GC.

Similarly, the methyl esters of fatty acids C16: 1n7, C18: 0, and C18: 3n3 were identified in lower proportions (Núñez-Gastélum *et al.*, 2011).

DHA, EPA, among other fatty acids could not be identified by gas chromatography due to the lack of standards. Additionally, other studies of shrimp by-products show that the highest proportion of fatty acids are unsaturated (Heu *et al.*, 2003; Núñez-Gastélum *et al.*, 2011; Takeungwongtrakul *et al.*, 2012; Gulzar and Benjakul, 2018).

Regarding the antibacterial activity of the FFA found in CeHex, their main target is the cell membrane, producing disruption of the electron transport chain (ETC) and oxidative phosphorylation, interfering with cellular energy production, inhibition of fatty acid biosynthesis enzyme activity, impair active nutrient uptake, and induces autolysis and leakage of cell metabolites by pore formation (Desbois and Smith, 2010; Yoon *et al.*, 2018).

Oleic acid treatment in *S. aureus* increases membrane permeability and fluidity, leading to cell death (Chamberlain *et al.*, 1991); while, a linolenic acid treatment induces the release of intracellular content. Moreover, linoleic acid induces the disruption of the ETC in *S. aureus* (Greenway and Dyke, 1979). Also, oleic acid or linoleic acid, produce lysis of *Streptococcus faecalis* (Carson and Daneo-Moore, 1980).

Finally, regarding to the anti-*M. bovis* BCG activity of CeHex, MIC values of linolenic acid (α - and γ - form) and conjugated linoleic acid (CLA) against the viability of *M. tuberculosis* were determined as 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Choi, 2016). Palmitic, linoleic and oleic acid have MICs of 25-50, 50-100, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *M. tuberculosis* H37Rv (Sandoval-Montemayor *et al.*, 2012). Increased levels of myristic, palmitic, oleic, and linoleic fatty acids in sera of guinea pigs induced tuberculocidal effect toward *M.*

bovis BCG (Kochan and Berendt, 1974); long-chain fatty acids (oleic, linoleic, myristic, lauric, and palmitic) were reported to be mycobactericidal; while unsaturated fatty acids showed strong bactericidal activity in low concentrations (Kondo and Kanai, 1972; Kanetsuna, 1985).

CONCLUSIONS

Shrimp cephalothorax was the most promising by-product tested with antibacterial and antimycobacterial potential. Hexanic (non-polar) extract of shrimp cephalothorax resulted the most active against Gram-positive, Gram-negative bacteria, and *M. bovis* BCG. GC analysis of CeHex demonstrated the presence of three main, and four minoritarian, fatty acids. The strong antibacterial activity of CeHex and the identification of its main chemical constituents justify further studies on its biomedical and nutraceutical applications of this marine by-product. To the best of our knowledge, this is the first report of the antibacterial properties and chemical characterization of CeHex.

ACKNOWLEDGEMENTS

Author Martin Hernandez-Zazueta thanks Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Mexico) for his Ph.D. scholarship [grant numbers: 329334] and the funding provided for this project [grant number: A1-S-9762]. Coronado-Aceves E.W. thanks "Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM)" for the post-doctoral fellowship. Tavera-Hernández R. is thankful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Scholarship 662794) and Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM. The authors are thankful to Lucía del Carmen Márquez, Lucero Mayra Ríos Ruíz, Eréndira García, Elizabeth Huerta Salazar and Rubén Gaviño Ramirez for technical assistance.

REFERENCES

- AlFaris, N.A., Alshammari, G.M., AlTamimi, J.Z., AlMousa, L.A., Alagal, R.I., AlKehayez, N.M., Aljabryn, D.H., Alsayadi, M.M. and Yahya, M.A. 2021. Evaluating the effects of different processing methods on the nutritional composition of shrimp and the antioxidant activity of shrimp powder. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 29: 640-649.
- Ataf, M., Miller, C. H., Bellows, D. S. and O'Toole, R. 2010. Evaluation of the *Mycobacterium smegmatis* and BCG models for the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. *Tuberculosis*. 90: 333-337.
- Armenta, R.E., Guerrero-Legarreta, I. and Huerta, S. 2002. Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentados. *Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química*. 1: 49-55.
- Baizman, E. R., Branstrom, A. A., Longley, C. B., Allanson, N., Sofia, M. J., Gange, D., and Goldman, R. C. 2000. Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase. *Microbiology*. 146: 3129-3140.
- Bayona, L. M., Videnova, M., and Choi, Y. H. 2018. Increasing metabolic diversity in marine sponges extracts by controlling extraction parameters. *Marine drugs*. 16: 393.
- Bharathi, R., Vigneshpriya, D. and Krishnaveni, N. 2019. Comparison of proximate and fatty acid composition of shell of marine edible shrimps, *Heterocarpus gibbosus* (Bate, 1888) and *Aristeus alcocki* (Ramadan, 1938). *International Journal of Zoology and Applied Biosciences*. 4: 75-79.
- Brown, D. G., Lister, T. and May-Dracka, T. L. 2014. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 24: 413-418.
- Carson, D.D. and Daneo-Moore, L. Effects of fatty acids on lysis of *Streptococcus faecalis*. 1980. *Journal of Bacteriology*. 141: 1122-1126.
- Chamberlain, N. R., Mehrtens, B. G., Xiong, Z. H. U. O., Kapral, F. A., Boardman, J. L. and Rearick, J. I. 1991. Correlation of carotenoid production, decreased membrane fluidity, and resistance to oleic acid killing in *Staphylococcus aureus* 18Z. *Infection and Immunity*. 59: 4332-4337.
- Choi, W. H. 2016. Evaluation of anti-tubercular activity of linolenic acid and conjugated-linoleic acid as effective inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9: 125-129.
- Collins, L. A., and Franzblau, S. G. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 1004-1009.
- Coronado-Aceves, E.W., Sánchez-Escalante, J.J., López-Cervantes, J., Robles-Zepeda, R. E., Velázquez, C., Sánchez-Machado, D. I., and Garibay-Escobar, A. 2016. Antimycobacterial activity of medicinal plants used by the Mayo people of Sonora, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 190: 106-115.
- Daletos, G., Ancheeva, E., Chaidir, C., Kalscheuer, R., and Proksch, P. 2016. Antimycobacterial metabolites from marine invertebrates. *Archiv der Pharmazie*. 349: 763-773.
- Desbois, A. P. and Smith, V. J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1629-1642.
- Djellouli, M., López-Caballero, M. E., Arancibia, M. Y., Karam, N. and Martínez-Alvarez, O. 2020. Antioxidant and antimicrobial enhancement by reaction of protein hydrolysates derived from shrimp by-products with glucosamine. *Waste and Biomass Valorization*. 11: 2491-2505.
- Greenway, D. L. A. and Dyke, K. G. H. 1979. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 115: 233-245.
- Gulzar, S. and Benjakul, S. 2018. Ultrasound waves increase the yield and carotenoid content of lipid extracted from Cephala thorax of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *European Journal of Lipid Science and Technology*. 120: 1700495.
- Guzmán-Gutiérrez, S. L., Silva-Miranda, M., Kregel, F., Huerta-Salazar, E., León-Santiago, M., Díaz-Cantón, J. K., Espitia-Pinzón, C. and Reyes-Chilpa, R. 2020. Antimycobacterial Activity of Alkaloids and Extracts from *Tabernaemontana alba* and *T. arborea*. *Planta Medica*. 88: 53-61.
- Hernández-Zazueta, M. S., García-Romo, J. S., Noguera-Artiaga, L., Luzardo-Ocampo, I., Carbonell-Barrachina, Á. A., Taboada-Antelo, Campos-Vega, R., Rosas-Burgos, E.C., Burboa-Zazueta, M. G., Ezquerra-Brauer, J. M., Martínez-Soto, J. M., Santacruz-Ortega, H. C. and Burgos-Hernández, A. 2021a. *Octopus vulgaris* ink extracts exhibit antioxidant, antimutagenic, cytoprotective, antiproliferative, and proapoptotic effects in selected human cancer cell lines. *Journal of Food Science*. 86: 587-601.
- Hernández-Zazueta, M. S., Luzardo-Ocampo, I., García-Romo, J. S., Noguera-Artiaga, L., Carbonell-Barrachina, Á. A., Taboada-Antelo, Campos-Vega, R., Rosas-Burgos, E. C., Burboa-Zazueta, M. G., Ezquerra-Brauer, J. M. and Burgos-Hernández, A. 2021b. Bioactive compounds from *Octopus vulgaris* ink extracts exerted anti-proliferative and anti-inflammatory effects *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*. 151: 112119.
- Heu, M.S., Kim, J.S. and Shahidi, F. 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*. 82: 235-242.
- Jurno, A. C., Netto, L. O. C., Duarte, R. S., and Machado, R. R. P. 2019. The search for plant activity against tuberculosis using breakpoints: A review. *Tuberculosis*. 117: 65-78.
- Kandra, P., Challa, M.M. and Kalangi P.J.H. 2012. Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93: 17-29.
- Kanetsuna, F. 1985. Bactericidal effect of fatty acids on mycobacteria, with particular reference to the suggested mechanism of intracellular killing. *Microbiology and Immunology*. 29: 127-141.
- Kochan, I., and Berendt, M. 1974. Fatty acid-induced tuberculocidal activity in sera of guinea pigs treated with bacillus Calmette-Guerin and lipopolysaccharide. *Journal of Infectious Diseases*. 129: 696-704.
- Kondo, E. and Kanai, K. 1972. The lethal effect of long-chain fatty acids on mycobacteria. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 25: 1-13.
- Laport, M. S., Santos, O. C. S., and Muricy, G. 2009. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*. 10: 86-105.
- Lefebvre, T., Destandau, E., and Lesellier, E. 2021. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*. 1635: 461770.
- López-Cervantes, J., Adan-Bante, N.P. and Sánchez-Machado, D.I. 2010. Separation and biochemical characterization of the products from fermented shrimp wastes. In: Le Behan, E. (Ed.), *Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application*. Transworld Research Network. 2010: 1-16.

- López-Saiz, C.M., Hernández, J., Cinco-Moroyoqui, F.J., Velázquez, C., Ocaño-Higuera, V.M., Plascencia-Jatomea, M., Robles-Sánchez, M., Machi-Lara, L. and Burgos-Hernández, A. 2016. Antimutagenic compounds of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): isolation and structural elucidation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016: 1-7.
- López-Saiz, C.M., Velázquez, C., Hernández, J., Cinco-Moroyoqui, F.J., Plascencia-Jatomea, M., Robles-Sánchez, M., Machi-Lara, L. and Burgos-Hernández, A. 2014. Isolation and structural elucidation of antiproliferative compounds of lipidic fractions from white shrimp muscle (*Litopenaeus vannamei*). International Journal of Molecular Sciences. 15: 23555–23570.
- Mandeville, S., Yaylayan, V. and Simpson, B.K.. 1992. Proximate analysis, isolation and identification of amino acids and sugars from raw and cooked commercial shrimp waste. Food Biotechnology. 6: 51-64.
- Mugumbate, G., and Overington, J. P. 2015. The relationship between target-class and the physicochemical properties of antibacterial drugs. Bioorganic & medicinal chemistry. 23: 5218-5224.
- Mukherjee, G., Mukhopadhyay, B. and Sil, A. K. 2021. Edible marine algae: a new source for anti-mycobacterial agents. Folia microbiologica. 66: 99-105.
- Mohanasrinivasan, V., Mishra, M., Paliwal, J. S., Singh, S. K., Selvarajan, E., Suganthi, V., and Devi, C. S. 2014. Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. Biotech. 4: 167-175.
- Molina-Salinas, G. M., Ramos-Guerra, M. C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Becerril-Montes, P., and Said-Fernández, S. 2006. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Archives of Medical Research. 37: 45-49.
- Navarro-Navarro, M., Ruiz-Bustos, P., Valencia, D., Robles-Zepeda, R., Ruiz-Bustos, E., Virués, C., Hernández, J., Domínguez, Z. and Velazquez, C. 2013. Antibacterial activity of Sonoran propolis and some of its constituents against clinically significant *Vibrio* species. Foodborne Pathogens and Disease. 10: 150-158.
- Nirmal, N. P., Santivarangkna, C., Rajput, M. S. and Benjakul, S. 2020. Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective. Trends in Food Science & Technology. 103: 20-35.
- Núñez-Gastélum, J. A., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Paseiro-Losada, P., Sendón, R., Sanches-Silva, A.T., Costa, H.S., Aurrekoetxea, G.P., Angulo, I. and Soto-Valdez, H. 2011. Evaluación físico-química de aceite pigmentado obtenido de la cabeza de camarón. Grasas y Aceites. 62: 321-327.
- Nwanna, L. C., Balogun, A. M., Ajenifuja, Y. F. and Enujiugha, V. N. 2004. Replacement of fish meal with chemically preserved shrimp head in the diets of African catfish, *Clarias gariepinus*. Journal of Food Agriculture and Environment. 2: 79-83.
- Osuna-Ruiz, I., López-Saiz, C. M., Burgos-Hernández, A., Velázquez, C., Nieves-Soto, M., and Hurtado-Oliva, M. A. 2016. Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. Pharmaceutical Biology. 54: 2196-2210.
- Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., and Portaels, F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46: 2720-2722.
- Peñuelas-Urquides, K., Villarreal-Treviño, L., Silva-Ramírez, B., Rivadeneyra-Espinoza, L., Said-Fernández, S., and León, M. B. D. 2013. Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth: a correlation of the optical measurements with colony forming units. Brazilian Journal of Microbiology. 44: 287-290.
- Pettit, G. R., Knight, J. C., Collins, J. C., Herald, D. L., Pettit, R. K., Boyd, M. R. and Young, V. G. 2000. Antineoplastic agents 430. Isolation and structure of cribostratins 3, 4, and 5 from the Republic of Maldives *Cribochalina* species. Journal of Natural Products. 63: 793-798.
- Raju, N., Gulzar, S., Buamard, N., Ma, L., Ying, X., Zhang, B., and Benjakul, S. 2021. Comparative Study of Astaxanthin, Cholesterol, Fatty Acid Profiles, and Quality Indices Between Shrimp Oil Extracted From Hepatopancreas and Cephalothorax. Frontiers in Nutrition. 8.
- Rwegasila, E., Mubofu, E.B., Nyandoro, S. S., Erasto, P. and Munissi, J. J. 2016. Preparation, characterization and *in vivo* antimycobacterial studies of panchovillin-chitosan nanocomposites. International Journal of Molecular Sciences. 17: 1559.
- Sachindra, N.M., Bhaskar, N. and Mahendrakar, N.S. 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. Waste Management. 26: 1092-1098.
- Sandoval-Montemayor, N. E., García, A., Elizondo-Treviño, E., Garza-González, E., Alvarez, L. and del Rayo Camacho-Corona, M. 2012. Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. Molecules, 17(9), 11173-11184.
- Senevirathne, M., and Kim, S. K. 2012. Utilization of seafood processing by-products: medicinal applications. Advances in Food and Nutrition Research. 65: 495-512.
- Takeungwongtrakul, S., Benjakul, S. and H-kittikun, A. 2012. Lipids from cephalothorax and hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Compositions and deterioration as affected by iced storage. Food Chemistry. 134: 2066-2074.
- Taneja, N. K. and Tyagi, J. S. 2007. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 60: 288-293.
- TheFishSite: Mexican shrimp sector set for 177,000 tonne year. [Consulted in December 21, 2021] 2021. Available in: <https://thefishsite.com/articles/mexican-shrimp-sector-set-for-177-000-tonne-year>
- Torres, Y. R., Berlinck, R. G., Nascimento, G. G., Fortier, S. C., Pessoa, C. and de Moraes, M. O. 2002. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosciera brasiliensis*. Toxicon. 40: 885-891.
- Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Lugo E, Goycoolea FM, Velazquez EF, Astiazaran H, and Hernandez, J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. Journal of Applied Microbiology. 103: 1747-1756.
- Vilar-Junior, J. C., Ribeaux, D. R., Alves da Silva, C. A., Campos-Takaki, D. and Maria, G. 2016. Physicochemical and antibacterial properties of chitosan extracted from waste shrimp shells. International Journal of Microbiology, 2016: 7.
- Wang, L., Wang, J., Liu, J. and Liu, Y. 2018. Antitubercular marine natural products. Current Medicinal Chemistry. 25: 2304-2328.

Use of mezcal vinasses to produce methane by co-digestion with bovine manure

Uso de vinazas de mezcal para producir metano por co-digestión con estiércol de bovino

Zelaya-Benavidez EA*, Martínez-Gutiérrez GA, Robles C, Morales I

Instituto Politécnico Nacional – Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca. Hornos No. 1003, Col. Nochebuena, CP 71230, Santa Cruz Xoxocotlan. Oaxaca, Mexico.

RESUMEN

Se investigó la mejor proporción de co-digestión entre vinazas de mezcal y estiércol de bovino para producir metano. Se compararon cinco mezclas de vinazas con estiércol en diferentes proporciones (v/v): 25-75, 50-50, 75-25, 100-0 y 0-100, con seis repeticiones. Como reactores se utilizaron envases de vidrio de 496 mL con sello hermético, con 300 mL de volumen activo en condiciones mesofílicas (36 ± 1 °C) durante 10 días. El pH, los sólidos totales y los sólidos volátiles de vinazas, estiércol de bovino y sus mezclas se determinaron por triplicado. El volumen acumulado de metano fue mayor con 0-100 y 75-25, seguido por el 100-0; con 286.23, 286.40 y 225.48 NmL de CH_4 , respectivamente. El rendimiento de metano fue mayor con 100-0 y 75-25 con 28.27 y 22.77 NmL de $\text{CH}_4 \text{ g}^{-1}$ sólidos volátiles, respectivamente. El modelo de crecimiento bacteriano de Gompertz mostró que el período de adaptación de los microorganismos en las vinazas fue mayor que en el estiércol de bovino. La co-digestión de vinazas y estiércol de bovino en una proporción de 75-25 % mejoró la producción de metano 26.7 % con respecto a la digestión de vinazas solas y redujo el tiempo de adaptación de las bacterias a éstas en 4.12 días.

Palabras clave: agave, residuos agroindustriales, biogás, biometano.

ABSTRACT

The best co-digestion ratio between mezcal vinasses and bovine manure was investigated to produce methane. Five vinasses and bovine manure mixtures in different proportions were compared (v/v): 25-75, 50-50, 75-25, 100-0, and 0-100, with six replications. As reactors, 496 mL glass containers with hermetic seal were used, with 300 mL of active volume under mesophilic conditions (36 ± 1 °C) for 10 days. The pH, total solids, and volatile solids of vinasses, bovine manure, and their mixtures were determined in triplicate. The methane accumulated volume was greater with the 0-100 and 75-25, followed by the 100-0, with 286.23, 286.40, and 225.48 NmL CH_4 , respectively. Methane yield was higher with 100-0 and 75-25 with 28.27 and 22.77 NmL $\text{CH}_4 \text{ g}^{-1}$ volatile solids, respectively. The Gompertz bacterial growth model showed that the micro-organisms adaptation period in vinasses was longer than in bovine manure. Co-digestion of vinasses and bovine manure in proportion 75-25 % improved the methane production by 26.7 % with respect to the

digestion of vinasses alone, and reduced the adaptation time of bacteria to vinasses by 4.12 days.

Key words: agave, agro-industrial waste, biogas, biomethane.

INTRODUCTION

In Mexico, the growing of *Agave* crops such as *A. angustifolia* Haw. and *A. tequilana* Weber to produce mezcal and tequila, respectively, has socioeconomic and environmental relevance. The state of Oaxaca produces 92.3 % of mezcal in Mexico; in 2018, the agave-mezcal production chain generated 19,000 direct jobs and 85,000 indirect jobs, making it the greatest economic activity in the state (CRM, 2019). However, the by-products that this agro-industry generates, bagasse and vinasses, have a strong environmental impact when discharged without treatment. For every liter of mezcal produced in a factory with intermediate technology, 9 to 15 L of vinasses are generated (Beltrán *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2006). In 2018, the Mexican states that manufactured spirits from *Agave* species with a protected designation of origin, produced 5,914,200 L of mezcal (CRM, 2019), generating at the same time between 53,227,800 and 88,713,000 L of vinasses. It is estimated that each year 80 % of vinasses is discharged directly into rivers, lakes, and water reserves or municipal drainage systems, as well as agricultural land, without treatment (Rodríguez and De La Cerna, 2017). Thus, in Mexico, annually between 42,582,240 and 70,979,400 L of vinasses are spilled into the environment with harmful effects due to its recalcitrance, resistance to biological or chemical degradation, and corrosive and contaminating properties (Cervantes-Carrillo, 2008; Heredia-Solís *et al.*, 2014).

Therefore, the treatment and use of this residue are urgently needed. Energy recovery as methane through anaerobic digestion (AD) is one option (Robles-González *et al.*, 2012; Arreola-Vargas *et al.*, 2016). However, the acidic pH and high content of phenolic and ferulic compounds derived from the thermal hydrolysis of lignin, which is present in vinasses, might inhibit methanogenesis (Chávez and Domine, 2010; Paul *et al.*, 2018). Recent research has shown that due to its sugar content, mezcal vinasses inoculated with bovine manure is an efficient substrate for AD (López-Velarde *et al.*, 2020).

Given this, co-digestion or simultaneous digestion of two or more substrates, improves AD and methane yield,

*Autor para correspondencia: Edwin Alfonso Zelaya Benavidez
 Correo electrónico: edwinzelayab@gmail.com

Recibido: 31 de mayo de 2021

Aceptado: 8 de marzo de 2022

utilizing nutrient balance and improvement of the medium buffer capacity (Akyol *et al.*, 2016); i.e., the co-digestion of cow dung and maize waste in batch reactors improved the biogas yield by 92 % when a 10:5 cow dung:maize waste ratio was used compared with a 10:1 ratio (Abdoli *et al.*, 2014); the co-digestion of llama (*Lama glama*), sheep (*Ovis orientalis aries*), and cattle (*Bos primigenius taurus*) manures in a semi-continuous system increased methane yield by more than 50 % compared to only llama manure (Álvarez and Lidén, 2009). López-Velarde *et al.* (2019) improved the buffer capacity of the mixture by using activated sludge at a pH of 7 to evaluate vinasses adaptation to inoculation in a semi-continuous flow reactor; they obtained up to 85.5 mL CH₄ g⁻¹ volatile solids (VS) of vinasses. However, some doubts remain, especially when the vinasses content in mixtures increases. In contrast, there is an inhibitory effect by increasing the amount of mezcal vinasses in the co-digestion with substrates like agave bagasse. In this regard, Gómez-Guerrero *et al.* (2019) evaluated the co-digestion of mezcal vinasses and two particle sizes of agave bagasse (1 and 100 mm), inoculated with pig manure and granular sludge in batch flow reactors. Methane production with 100 mm of bagasse decreased 76 % by substituting 12 % of the reactor working volume for vinasses and stopped after 24 % substitution.

Therefore, it is important to study other options for the co-digestion of mezcal vinasses with local substrates abundantly available in mezcal production areas, such as bovine manure (BM) in different proportions, to determine its optimal level of use in biodigesters. The aim of the present work was to investigate the best proportion of co-digestion between the vinasses and BM to produce methane in a batch system.

MATERIALS AND METHODS

Substrates and inoculum

The study was carried out from January to May 2019 in the Soils Laboratory of CIIDIR Oaxaca, in Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca, Mexico (17° 01' 30.3" N and 96° 43' 12.5" W, at 1530 meters above sea level). The BM was donated by the municipal slaughterhouse of Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca. The vinasses were obtained at the end of the distillation process at the "Don Agave" mezcal factory, located in the municipality of Tlacolula de Matamoros, Oaxaca. Both substrates were stored at 4 °C until their use. The inoculum was prepared from the effluent of an active biodigester from a pig farm in Santa Ana Zegache, Oaxaca. A mixture of the effluent, water, vinasses, and BM in 4:2:1:1 volume/volume ratio (v/v), respectively, was prepared for its adaptation (Angelidaki *et al.*, 2009) and incubated under mesophilic conditions (36 ± 1 °C) in a water bath, in two airtight plastic containers of 10.1 L each, with 9 L of liquid volume per container, for 25 days until gas production stopped. The pH, total solids (TS), and VS of the substrates and inoculum were determined in triplicate according to APHA (APHA, 2012). The pH was determined with a Hanna brand digital potentiometer (Hanna Instruments[®]), TS and VS were determined using an oven at 105 and 550 °C

until constant weight with a digital analytical balance (model MSL, Brand Mettler Toledo[®]), respectively.

Experimental design and data collection

A completely randomized design with six repetitions per treatment was used. Five vinasses-BM (V-BM) mixtures at different percentage (v/v) proportions (25-75, 50-50, 75-25, 100-0, and 0-100) were used as treatments, with no pH adjustment nor TS balance to reproduce as normal conditions as possible. The experimental unit consisted of a 496 mL glass bottle with a metal lid and hermetic seal, with 300 mL of active volume, consisting of 75 mL of V-BM mixture, according to the proportions described above, 75 mL of water to avoid overload and keeping TS content below 10 % which is optimal for AD performance (Lorenzo-Acosta and Obaya-Abreu, 2005; Angelidaki *et al.*, 2009), and 150 mL of previously prepared inoculum, and immersed in water in mesophilic conditions (36 ± 1 °C) for 10 days to promote methanogenic activity (Espinoza-Escalante *et al.*, 2009; Abdoli *et al.*, 2014). The experiment was stopped when the volume of biogas produced per day during the last three days was <1 % of the total accumulated biogas (Holliger *et al.*, 2016).

The biogas produced per day and accumulated during the evaluation period, normalized (NmL) to standard temperature and pressure (273.15 °K, 101.33 kPa), was obtained using the ideal gas law equation (Holliger *et al.*, 2016). Biogas methane content was determined by the volumetric displacement method of 5 % NaOH solution (Viquez, 2017). The methane yield was obtained with equation 1:

$$Y_{CH_4} = \left(\frac{A_V * \%_{CH_4}}{VS_R} \right) \quad (\text{Equation 1})$$

where Y_{CH_4} is the methane yield (NmL CH₄ g⁻¹ VS), A_V is the accumulated volume of biogas during the period of the experiment (NmL CH₄), and VS_R is the mass of volatile solids in grams added to the reactor. The daily methane yield was calculated dividing the accumulated yield by 10, which corresponds to the number of days of the experiment.

Statistical analysis

An analysis of variance was used to determine significant differences between treatments in the accumulated volume of methane, a means separation Tukey test was used to determine the best V-BM proportion according to data. To identify the critical stages of AD, such as the start of methane production and the microbial adaptation phase (Zwietering *et al.*, 1990) a nonlinear regression (p<0.05) was performed with the collected data, using the SPSS v. 22 software (Statistical Package for the Social Sciences) to adjust the methane yield to the Gompertz bacterial growth model (Equation 2).

$$P = A \exp^{-\exp\left(\frac{\mu_{me}}{A}(\lambda-t)+1\right)} \quad (\text{Equation 2})$$

In this model, methane production is proportional to microbial activity. P is the prediction of methane production in a certain period (t), A is the accumulated volume of meth-

ane in a given time ($\text{NmL CH}_4 \text{g}^{-1} \text{VS}$), μ_m is the maximum rate of methane yield per day ($\text{NmL CH}_4 \text{g}^{-1} \text{VS d}^{-1}$) defined by the tangent of the slope in the exponential growth phase of bacteria, and λ is the adaptation period (d) defined by the intercept of the line of the slope with the x-axis (Zwietering *et al.*, 1990).

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the inoculum, substrates, and mixtures

Fresh vinasses presented acidic pH compared to bovine manure. The pH of the inoculum adapted to the vinasses was slightly alkaline, higher than vinasses. The highest vinasses content presented a more acidic pH than those with the highest manure content. The pH in 100-0 treatment was higher than the original substrates because of the 75 mL of water added to avoid overload of the system. The content of total solids and volatile solids of vinasses was lower than that of the inoculum, and bovine manure. The vinasses-bovine manure mixtures showed different total solids content. The 100-0 mix had the lowest total solids and volatile solids content, while the 0-100 mix had the highest content (Table 1).

The acidity of vinasses is determined by the content of organic acids, such as acetate, which is synthesized during the fermentation of the agave sugars to obtain alcohol; therefore, as the vinasse in the mixture increases, the pH becomes acidic. On the other hand, bovine manure addition to the mixture increased pH to a methanogenic level. The vinasses pH was comparable to that reported by other researchers for mezcal vinasses with values between 3.5 and 4.77 (Gómez-Guerrero *et al.*, 2019; López-Velarde *et al.*, 2019). The initial pH of the mixtures studied was at optimal levels for anaerobic digestion (6.8 and 7.4), except for the 100-0 mixture with 5.49, which is closest to the optimal pH level of acidogenic bacteria, between 5.5 and 6.5 (Khanal, 2009). When inhibitions to vinasses anaerobic digestion occur with pH values lower than 5.0 (Gómez-Guerrero *et al.*, 2019), pH adjustments are needed to carry out the anaerobic digestion (Espinoza-Escalante *et al.*, 2009).

The total solids content of vinasses studied was similar to those obtained from industrial-type mezcal factories in Oaxaca (43.4 g L^{-1}) (Villalobos *et al.*, 2009) and San Luis Potosí (49.17 g L^{-1}) (López-Velarde *et al.*, 2019), but lower than artisan-type factories ($91-94.7 \text{ g L}^{-1}$) (Gómez-Guerrero *et al.*, 2019). In contrast, the volatile solids content of vinasses was lower than those from artisan-type mezcal factories (72 g L^{-1}) (Gómez-Guerrero *et al.*, 2019) and Comiteco liquor vinasses (62.90 g L^{-1}) obtained from agave juices (Cruz-Salomón *et al.*, 2017). Regarding total solids content, it was less than 10 % in all vinasses-bovine manure mixtures, values below which the anaerobic digestion “usually operates in better conditions” (Lorenzo-Acosta and Obaya-Abreu, 2005). It was found that food waste anaerobic digestion performance was improved by increasing total solids content from 5 to 20 % (Yi *et al.*, 2014). In these studied mixtures, the volatile solids content was recorded in the 20 to 60 g L^{-1} range, recommended for anaerobic digestion tests (Holliger *et al.*, 2016), except for treatment 0-100, which had lesser values.

pH changes in mixtures

In the V-BM mixtures the pH increased as a function of the bovine manure content, decreasing significantly ($p < 0.0001$) in every mixture at the end of the experiment (5.64 ± 0.87). The lowest pH value was obtained in the mixtures with the highest vinasses content (Figure 1).

Archaea bacteria synthesize volatile fatty acids during the acidogenesis stage for methane synthesis, thus the pH values of the mixtures during anaerobic digestion decreases (Khanal, 2009; Pibul and Towprayoon, 2015). The pH variation at the end of the anaerobic digestion process is expected when no pH conditioner is added (Gómez-Guerrero *et al.*, 2019), as in the present study. The highest and most significant pH variation in the mixtures with the highest bovine manure content could be due to a higher volatile fatty acids production, associated with higher total solids content used for its synthesis (Parra-Orobio *et al.*, 2015).

Table 1. Physicochemical characterization of the substrate, inoculum and vinasses-bovine manure (V-BM) mixtures used in the experiment of anaerobic co-digestion.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del sustrato, inóculo y mezclas de vinazas-estiércol bovino (V-EB) utilizadas en el experimento de co-digestión anaerobia.

Parameters	Inoculum / substrates						V-BM mixtures (%)									
	I		V		BM		100-0		75-25		50-50		25-75		0-100	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
pH	7.75	0.05	3.52	0.04	7.98	0.11	5.49	0.03	6.39	0.03	6.77	0.03	7.19	0.04	7.74	0.03
TS (%)	6.55	0.14	4.93	0.17	21.8	0.59	3.8	0.11	5.38	0.23	6.2	0.18	7.51	0.18	8.79	0.13
TS (g L^{-1})	64.7	0.72	46.2	2.01	243	8.23	37	0.57	54.6	3.04	62.4	1.57	72.1	3.94	90.6	3.99
VS (g L^{-1})	54.4	0.68	42.3	1.60	193	6.02	26.7	0.60	42	2.07	48.2	1.23	56.8	3.16	66.2	5.00

I, inoculum; V, vinasse; BM, bovine manure; SD, standard deviation; TS, total solids; VS, volatile solids.

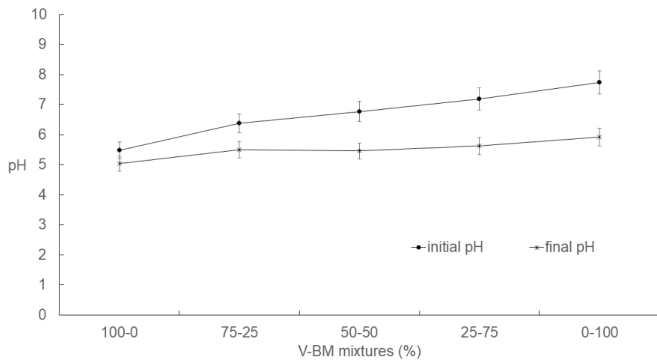


Figure 1. pH changes of the vinasses-bovine manure (V-BM) mixtures at the beginning and at the end of the experiment.

Figura 1. Cambios de pH de las mezclas de vinazas-estiércol bovino (V-EB) al inicio y al final del experimento.

Methane production

The accumulated volume of methane was significantly different ($p < 0.05$) between vinasses-bovine manure mixtures. The highest volume was obtained with 0-100 and 75-25 mixtures, with no significant difference between them, and the lowest volume with 25-75 and 50-50 mixtures. The 100-0 mix produced an intermediate methane volume (Figure 2).

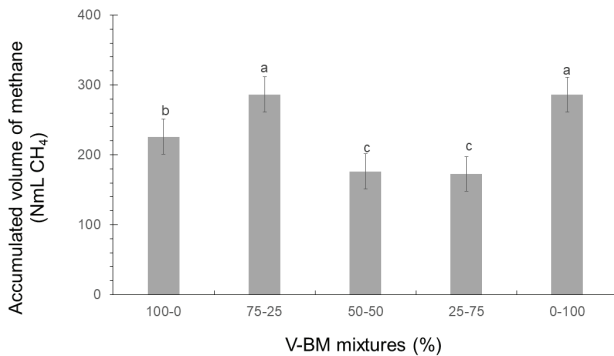


Figure 2. Methane accumulated volume from the vinasses-bovine manure (V-BM) mixtures. Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Figura 2. Volumen acumulado de metano de las mezclas de vinazas-estiércol bovino (V-EB). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Substrates such as vinasses, with dissolved organic matter and highly degradable sugars, allow higher methane yields (Yi *et al.*, 2014) due to fructans present in the agave “piñas” (Vera-Guzmán *et al.*, 2009; Chávez-Parga *et al.*, 2016). During their cooking in the mezcal process, fructans are hydrolyzed into fermentable sugars, mainly fructose, glucose, xylose, and maltose, at different concentrations according to the degree of plant ripeness. These sugars are used in microbial fermentation for alcohol synthesis (Michel-Cuello *et al.*, 2008). However, a portion of the sugars cannot be fermented and go to vinasses; for example, 77.1 mg g⁻¹ of total sugars were found in the wort after fermentation, i.e., 14 % of the

initial total present in the juice of the cooked agave “piñas” (Vera-Guzmán *et al.*, 2009), and 51 mg g⁻¹ of total sugars in vinasses after distillation (López-Velarde *et al.*, 2019). These sugars present in vinasses, along with other suspended organic solids (Espinoza-Escalante *et al.*, 2009), are used by bacteria during anaerobic digestion to obtain energy and forward substrates for methanogenesis. In the case of the 75-25 mix, the bacterial community present in bovine manure uses these sugars and the optimized pH conditions to produce methane. The 75-25 and 0-100 mixtures had the highest cumulative methane production with 286.40 and 286.23 NmL CH₄, respectively. The 100-0 mix produced 225.98 NmL CH₄, ranking third; the 75-25 mix produced 26.7 % more methane than the 100-0 mix, indicating that vinasses-bovine manure co-digestion can be used for improving methane production from the mezcal vinasses.

Methane yield kinetics

The bacterial kinetic curve coincided with the Gompertz prediction model growth. The mixtures with higher vinasses content obtained a higher accumulated methane yield, while mixtures with higher bovine manure content presented lower yields; in addition, they produced 80 % of the methane produced in the first four days, while the 100-0 mix obtained that production after six days, indicating that co-digestion with bovine manure reduces the digestion time of vinasses by two days (Figure 3).

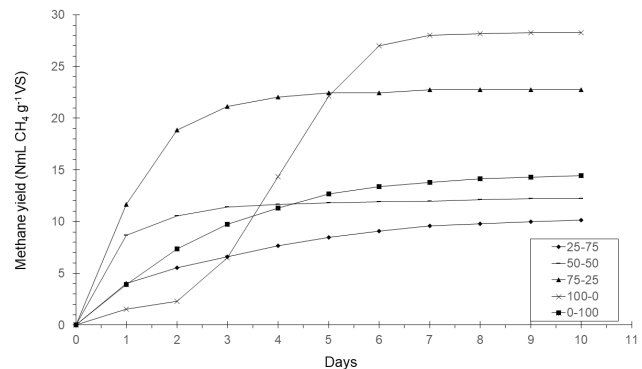


Figure 3. Methane yield kinetics from vinasses-bovine manure (V-BM) mixtures during the experimental period.

Figura 3. Cinética de los rendimientos de metano de las mezclas de vinazas-estiércol bovino (V-EB) durante el periodo experimental.

The methane yield expresses the volume of methane produced per gram of volatile solids invested in the system; this explains that despite having lower accumulated production (Figure 2), in the 100-0 mix methane yield was higher (28.27 NmL CH₄ g⁻¹ volatile solids) compared to the 0-100 mix (14.43 NmL CH₄ g⁻¹ volatile solids). Regarding the performance of the yield curve, the conversion rate of complex substrates such as vinasses with acidic pH presents a more prolonged hydrolysis stage at the start of anaerobic digestion, which was evidenced in the S-shaped methane yield curve. In contrast, simpler substrates with more balanced properties, such as neutral pH in mixtures with bovine manure, have shorter

incubation periods, as evidenced in the inverted L-shaped curve (Ware and Power, 2017).

The cumulative methane yield estimated by the Gompertz model was adjusted to the results obtained in the experiment with R^2 values close to 1 (Table 2). The bacterial kinetics for each of the vinasses-bovine manure mixtures described the expected bacterial growth behavior by the theoretical model. The 100-0 mix had the highest daily and cumulative return rate; nevertheless, it had the highest adaptation phase due to the lower pH value (Figure 2). This implies the need for a longer hydraulic retention time and larger reactors, or in the best case, pH adjustment. On the other hand, in the mixtures with bovine manure, the degradation began before its preparation, indicated by the λ negative values. This phenomenon is possibly caused by the microbiological activity present in the manure before the anaerobic digestion, which could start vinasses digestion in a shorter time, i.e., the 75-25 mix adaptation period was -1.83, which means that methane production started 4.12 days earlier than in the 100-0 mix, and had the best performance regarding the maximum rate of methane yield per day and cumulative methane yield, comparable to the 100-0 mix. This indicates that the vinasses-bovine manure co-digestion in a 75-25 proportion best favors the mezcal vinasses anaerobic digestion treatment process.

Table 2. Results of the Gompertz growth model for methane production from vinasses-bovine manure (V-BM) mixtures used in the experiment.

Tabla 2. Resultados del modelo de crecimiento de Gompertz para la producción de metano de las mezclas de vinazas-estiércol bovino (V-EB) utilizadas en el experimento.

V-BM mixtures	A (NmL CH ₄ g ⁻¹ VS)	μ_m (NmL CH ₄ g ⁻¹ VS d ⁻¹)	λ (d)	R ² (adjusted)
100-0	28.97	9.03	2.29	0.994
75-25	22.64	10.09	-1.83	0.998
50-50	12.08	3.68	-1.56	0.992
25-75	10.54	1.44	-0.17	0.999
0-100	14.44	3.02	-0.37	0.998

A, methane accumulated volume; μ_m , maximum rate of methane yield per day; λ , adaptation period; VS, volatile solids.

The accumulated methane yield was higher with a higher vinasses content because "vinasses are more efficient substrates for anaerobic digestion than other substrates due to the quantity of soluble sugars they contain", contrary to what happened with the cellulose present in the bovine manure (López-Velarde *et al.*, 2020). During the adaptation period, bacteria grow and prepare to hydrolyze organic compounds; it takes longer for complex substrates under acidic pH (Parra-Orobio *et al.*, 2014), such as the vinasses alone. Nevertheless, this period can be shortened by adding bovine manure, as shown by the 75-25 mix. The co-digestion of substrates demonstrates the shortening of the hydrolysis period, i.e., when maize waste was added to cow dung digestion, the incubation period was 4 days in contrast with 11 days for cow dung digestion alone (Abdoli *et al.*, 2014). Negative λ values

have been observed in anaerobic digestion bacterial growth curves of substrates with an initial bacterial load, such as bovine manure (Ware and Power, 2017; López-Velarde *et al.*, 2020). This implies that vinasses-bovine manure co-digestion favors the initial presence of a bacterial community for vinasses anaerobic digestion in a shorter time.

CONCLUSIONS

The vinasses-bovine manure co-digestion raised the pH and anticipated the start of anaerobic digestion by 2 days. The 75-25 vinasses-bovine manure mixture produced the highest accumulated methane production, with 286.40 NmL CH₄, 26.7 % more methane than vinasses alone. The highest methane yield was produced with the 100-0 mixture, with 28.27 NmL CH₄ g⁻¹ volatile solids, followed by the 75-25 mixture with 22.8 NmL CH₄ g⁻¹ volatile solids. The 100-0 mixture presented the most prolonged adaptation period of anaerobic digestion, 2.29 days. The vinasses-bovine manure co-digestion in proportion 75-25 was the best mixture to improve the mezcal vinasses anaerobic digestion process and shortened the bacterial adaptation period to 4.12 days.

ACKNOWLEDGMENTS

To CONACYT for scholarship 565495 for doctoral studies and the National Polytechnic Institute (IPN)- CIIDIR-OAXACA for the use of its facilities and support during this research.

REFERENCES

- Abdoli, M.A., Amiri, L., Baghvand, A., Nasiri, J., Madadian, E. 2014. Methane production from anaerobic co-digestion of maize and cow dung. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 33. 597–601.
- Akyol, Ç., Ozbayram, E.G., Ince, O., Kleinstueber, S., Ince, B. 2016. Anaerobic co-digestion of cow manure and barley: Effect of cow manure to barley ratio on methane production and digestion stability. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 35. 589–595.
- Álvarez, R., Lidén, G. 2009. Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production. *Biomass and Bioenergy*. 33. 527–533.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B. 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*. 59. 927–934.
- APHA. 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington, DC, USA.
- Arreola-Vargas, J., Jaramillo-Gante, E., N., Celis, B., L., Corona-González, González-Álvarez, V., Méndez-Acosta, H.O. 2016. Biogas production in an anaerobic sequencing batch reactor by using tequila vinasses: Effect of pH and temperature. *Water Science and Technology*. 73. 550–556.
- Beltrán, F.J., Álvarez, P.M., Rodríguez, E.M., García-Araya, J.F., Rivas, J. 2001. Treatment of high strength distillery wastewater (Cherry vinasses) by integrated aerobic biological oxidation and ozonation. *Biotechnology Progress*. 17. 462–467.

- Cervantes-Carrillo, F.J. 2008. Comunicación, AMC - Reconoce la AMC al líder del proyecto que estudia catalizadores para acelerar la degradación de contaminantes en acuíferos. Accessed 26th November 2020. Available at: <http://www.comunicacion.amc.edu.mx/comunicados/reconoce-la-amc-al-lider-del-proyecto-que-estudia-catalizadores-para-acelerar-la-degradacion-de-contaminantes-en-acuiferos>.
- Chávez, M., Domine, M.E. 2010. Lignina, estructura y aplicaciones métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances En Ciencias e Ingeniería*. 4. 15–46.
- Chávez-Parga, M.D., Pérez-Hernández, E., González-Hernández, J.C. 2016. Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 18. 148–164. doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552.
- CRM. 2019. El Mezcal: la cultura líquida de México. Oaxaca de Juárez. Accessed 24 June 2020). available at: http://www.crm.org.mx/periodico/PDF/Revista_El_Mezcal2.pdf. Cruz-Salomón, A., Meza-Gordillo, R., Lagunas-Rivera, S. and Ventura-Canseco, C. 2017. Biogas production potential from a native beverage vinasse of Mexico. *Waste Technology*. 5. 9–14.
- Cruz-Salomón, A., Meza-Gordillo, R., Lagunas-Rivera, S., Ventura-Canseco, C. 2017. Biogas production potential from a native beverage vinasse of Mexico. *Waste Technology*. 5. 9–14.
- Espinoza-Escalante, F.M., Pelayo-Ortiz, C., Navarro-Corona, J., González-García, Y., Bories, A., Gutiérrez-Pulido, H. 2009. Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of *Agave tequilana* Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane, *Biomass and Bioenergy*. 33. 14–20.
- Gómez-Guerrero, A.V., Valdez-Vázquez, I., Caballero-Caballero, M., Chiñas-Castillo, F., Alavéz-Ramírez, R., Montes-Bernabé, J.L. 2019. Co-digestion of *Agave angustifolia* Haw bagasse and vinasses for biogas production from mezcal industry. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 18. 1073–1083.
- Heredia-Solís, A., Esparza-Ibarra, E., Romero-Bautista, L., Cabral-Arellano, F., Bañuelos-Valenzuela, R. 2014. Bagazos de *Agave salmiana* y *Agave weberi* utilizados como sustrato para producir *Pleurotus ostreatus*. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1. 103–111.
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., et al. 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*. 74. 2515–2522.
- Jiménez, A.M., Borja, R., Martín, A., Raposo, F. 2006. Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*. *Journal of Environmental Management*. 80. 303–310.
- Khanal, S.K. 2009. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. 1st ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. doi.org/10.1002/9780813804545.
- López-Velarde S.M., Ventura-Ramos, E., Rodríguez-Morales, J.A., Oliver, H. 2020. Effect of inoculum source on the anaerobic digestion of mezcal vinasses at different substrate-inoculum ratios. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 36. 81–95.
- López-Velarde, S.M., Ventura-Ramos, E.J., Rodríguez-Morales, J.A., Hensel, O. 2019. Inoculum adaptation for the anaerobic digestion of mezcal vinasses. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 35. 447–458.
- Lorenzo-Acosta, Y., Obaya-Abreu, M. 2005. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. *ICIDCA*. XXXIX. 35–48.
- Michel-Cuello, C., Juárez-Flores, B.I., Aguirre-Rivera, J.R., Pinos-Rodríguez, J.M. 2008. Quantitative characterization of nonstructural carbohydrates of mezcal agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 5753–5757.
- Parra-Orobio, B., Torres-Lozada, P., Marmolejo-Rebellón L.F., Cárdenas-Cleves, L., Vásquez-Franco, C., Torres-López, W., Ordoñez-Andrade, J. 2015. Efecto de la relación sustrato-inóculo sobre el potencial bioquímico de metano de biorresiduos de origen municipal. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. 16. 515–526.
- Parra-Orobio, B.A., Torres-Lozada, P.T., Marmolejo-Rebellón, L.F., Cárdenas-Cleves, L.M., Vásquez-Franco, C., Torres-López, W.A., Ordoñez-Andrade, J.A. 2014. Influencia del pH sobre la digestión anaerobia de biorresiduos de origen municipal *Revista U.D.C.A Actualidad & Rudca*. 17. doi.org/10.31910/rudca.v17.n2.2014.421.
- Paul, S., Dutta, A., Defersha, F. 2018. Biocarbon, biomethane and biofertilizer from corn residue: A hybrid thermo-chemical and biochemical approach. *Energy*. 165. 370–384.
- Pibul, P., Towprayoon, S. 2015. Acid-stressed control of market waste anaerobic digestion using pH adjustment. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 34. 132–138.
- Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. 2012. Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of Biotechnology*. 157. 524–546.
- Rodríguez, A., De La Cerna, C. 2017. El mezcal, su producción y tratamiento de residuos. *Alianzas y Tendencias*. 2. 10–14.
- Vera-Guzmán, A.M., Santiago-García, P.A., López, M.G. 2009. Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32. 273–279.
- Villalobos, F., Robles, V., Poggi, H. 2009. Disminución de la materia orgánica biodegradable presente en vinazas mezcaleras mediante digestión anaerobia. *Universidad Tecnológica de la Mixteca*. Oaxaca.
- Viquez, J. 2017. Medición de metano a bajo costo. 9th RedBioLAC Congress. Argentina.
- Ware, A., Power, N. 2017. Modelling methane production kinetics of complex poultry slaughterhouse wastes using sigmoidal growth functions. *Renewable Energy*. 104. 50–59.
- Yi, J., Dong, B., Jin, J., Dai, X. 2014. Effect of increasing total solids contents on anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: Performance and microbial characteristics analysis. *PLoS ONE*. 9. e102548. doi.org/10.1371/journal.pone.0102548.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., van 'T Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56. 1875–1881.



***In vitro* anti-inflammatory and antioxidant activity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) proteins hydrolysate fractions**

Actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de fracciones de hidrolizado de proteínas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)

Juárez-Chairez MF¹, Meza-Márquez OG^{1*}, Márquez-Flores YK², Jiménez-Martínez C¹, Osorio-Revilla G¹

¹ Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Zacatenco. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Av. Wilfrido Massieu S/N, Esq. Cda. Miguel Stampa. Col. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco. Alcaldía Gustavo A. Madero. C.P. 07738. Ciudad de México, México.

² Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Zacatenco. Departamento de Farmacia. Av. Wilfrido Massieu S/N, Esq. Cda. Miguel Stampa. Col. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco. Alcaldía Gustavo A. Madero. C.P. 07738. Ciudad de México, México.

ABSTRACT

Chickpea is a legume with various biological activities. The anti-inflammatory and antioxidant activities of chickpea proteins hydrolysate fractions were evaluated. The extensive protein hydrolysate (greater than 50 %) obtained by enzymatic hydrolysis was fractionated and 5-10 kDa, 3-5 kDa, 1-3 kDa, and ≤ 1 kDa fractions were obtained. The anti-inflammatory activity was determined in murine peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Fractions F5-10 kDa, F3-5 kDa, F1-3 kDa presented the highest nitric oxide inhibition (76 %), Tumoral Necrosis Factor- α (93 %), and Interleukin-1 β (90 %) synthesis. Antioxidant activity was evaluated by ABTS, DPPH methods, Fe³⁺ reducing power and Cu²⁺ chelating capacity. Fraction F1-3 kDa showed higher inhibition of ABTS (78 %) and DPPH (7.76 %) radicals, besides the highest Fe³⁺ reducing capacity (0.508 Abs700nm); for Cu²⁺ chelating capacity F ≤ 1 kDa showed higher inhibition (52.60 %). Chickpea protein shows biological activities such as anti-inflammatory and antioxidant, so it can be considered as a source of low molecular weight bioactive peptides that can be used as alternative therapies for certain diseases related to chronic inflammation.

Keywords: Anti-inflammatory activity, antioxidant activity, protein hydrolysates, macrophages, *Cicer arietinum* L.

RESUMEN

El garbanzo es una leguminosa que tiene diversas actividades biológicas. La actividad antiinflamatoria y antioxidante de las fracciones de hidrolizado de proteínas de garbanzo fue evaluada. El hidrolizado de proteínas extensivo (mayor a 50 %) se obtuvo por hidrólisis enzimática, se fraccionó y se obtuvieron fracciones de 5-10 kDa, 3-5 kDa, 1-3 kDa y ≤ 1 kDa. La actividad antiinflamatoria se determinó en macrófagos peritoneales murinos estimulados con lipopolisacárido (LPS). Las fracciones de F5-10 kDa, F3-5 kDa, F1-3 kDa presentaron la mayor inhibición en la síntesis de óxido nítrico (76 %), Factor de Necrosis Tumoral- α (93 %) e interleucina-1 β (90 %). La actividad antioxidante fue evaluada por los métodos ABTS, DPPH, poder reductor de Fe³⁺ y capacidad quelante

de Cu²⁺. La fracción F1-3 kDa mostró mayor inhibición de los radicales ABTS (78 %) y DPPH (7.76 %), además mostró la mayor capacidad reductora de Fe³⁺ (0.508 Abs700nm), para capacidad quelante de Cu²⁺ la F ≤ 1 kDa mostró mayor inhibición (52.60 %). La proteína de garbanzo tiene actividades biológicas como antiinflamatoria y antioxidante, por lo que puede considerarse como una fuente de péptidos bioactivos de bajo peso molecular que pueden utilizarse como terapias alternativas para determinadas enfermedades relacionadas con la inflamación crónica.

Palabras clave: Actividad antiinflamatoria, actividad antioxidante, hidrolizados de proteínas, macrófagos, *Cicer arietinum* L.

INTRODUCTION

Inflammation is a physiological process that initiates in response to a bacterial infection or damaged vascularized living tissue (Hassan-Ahmed *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Although the fact that the response of this tissue is generally to protect itself, when it is uncontrollable, recurrent, or chronic, it can be associated with diseases such as asthma, obesity, rheumatoid arthritis, among others (Rizzello *et al.*, 2016). The main treatments used for inflammation are steroidal and non-steroidal drugs; however, their use is limited due to their multiple side effects, and therefore, interest is currently emerging for the development of alternative therapies from natural sources, which do not represent risks to health (Sharma *et al.*, 2011; Daliri *et al.*, 2017).

On the other hand, reactive oxygen species (ROS), free radicals, and peroxides can be generated in different metabolic processes or by adverse environmental exposures (Sies and Jones, 2020). Naturally, excess ROS are balanced by the cellular antioxidant system, however, when ROS accumulate beyond the cell's antioxidant capacity homeostasis is disrupted due to an imbalance between ROS production and the biological detoxification system, which causes oxidative stress (Guo *et al.*, 2014; Torres-Fuentes *et al.*, 2015). This has as a consequence of DNA, proteins, and lipids modifications, in addition to playing a significant role in the appearance of

*Autor para correspondencia: Ofelia Gabriela Meza Márquez
Correo electrónico: ogmmz@yahoo.com.mx

Recibido: 18 de octubre de 2021

Aceptado: 1 de febrero de 2022

diseases such as cancer, arteriosclerosis, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, neurological disorders, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and even chronic inflammation (Guo *et al.*, 2014; Elshafei, 2020).

Therefore, at present is important to search for endogenous antioxidant substances that act as direct scavengers of free radicals, or as chelating agents of metal ions that catalyze the generation of radical species, which could delay the progress of many chronic diseases or attenuate chronic inflammation (Zhang *et al.*, 2018; Rizzo, 2020).

Proteins and their peptides obtained from legumes have shown ABTS and DPPH radical inhibitory activity, reducing power, and metal chelating capacity (Samaei *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2020). Likewise, peptides that inhibit the production of pro-inflammatory mediators such as cyclooxygenase (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin (PG) E2 and D2, nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukins (IL)-1 β and IL-6 in RAW 264.7 macrophages stimulated by *E. coli* lipopolysaccharides (LPS), have been reported (Millán-Linares *et al.*, 2015; González-Montoya *et al.* 2018).

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is a rich source of protein (17-23 %), in addition to containing carbohydrates (70 %), lipids (4-10 %), vitamins (B group), and minerals like potassium, phosphorus, magnesium, and calcium (Ercan and Neheir, 2016; Mieszkowska and Marzec, 2016). Chickpea proteins have high bioavailability, and due to their amino acid profile after hydrolysis, peptides with hypolipidemic, antioxidant and antimicrobial activity, among others, have been identified (Ghribi *et al.*, 2015b; Shi *et al.*, 2019; Wali *et al.*, 2020). However, bioactive peptides isolated from enzymatically hydrolyzed chickpea proteins that show anti-inflammatory activity have not been reported. Therefore, the aim was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant effect of chickpea (*Cicer arietinum* L.) proteins hydrolysate fractions by *in vitro* evaluation of inflammatory mediators in LPS-activated murine peritoneal macrophages and on the inhibition of free radicals, so that, possibly the chickpea proteins hydrolysate fractions can be used to isolate bioactive peptides with anti-inflammatory activity.

MATERIALS AND METHODS

Material

Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) Valle Verde brand lot L7277G1B was obtained from a local supermarket. Murine peritoneal macrophages were isolated from ICR mice, fetal bovine serum (S1480) was purchased from Biowest (Riverside, MO, USA), antibiotic-antifungal (10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin, and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B) (A-07) was purchased from Vitro S. A. (Granada, Spain), Alcalase 2.4 L (EC3.4.21.62) and Flavourzyme (EC3.4.11.1) were purchased from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark), Pepsin from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1), Pancreatin from porcine pancreas (EC 232.468.9), 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2-20-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), RPMI-1640 medium (GIBCO 31800-014), lipopo-

lysaccharide from *E. coli* O55:B5 (L2880), TNF- α mouse ELISA Kit (RAB0477) and IL-1 β mouse ELISA Kit (RAB0274) were purchased from Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO, USA).

Preparation of chickpea defatted flour

Chickpeas were selected and ground (High speed electric pulverizer mill, XHH-39-WJY, EUA) and passed through a 35 mesh sieve, then the fat was removed from the flour to obtain a higher protein yield in the concentrate, for which it was resuspended in hexane (1:4 [w/v], flour: hexane) and placed in stirring (500 rpm) for 24 h at 4°C, then the solvent was removed by filtration and the powder was left to dry at room temperature for 24 h and finally stored at 4°C until further use (Mondor *et al.*, 2009).

Preparation of chickpea proteins concentrate and extraction of phenolic compounds

Chickpea proteins concentrate was obtained by isoelectric precipitation according to Ghribi *et al.* (2015a). Briefly, the defatted flour was mixed with distilled water in a proportion 1:10 w/v (flour: water), the pH was adjusted to 9.0 using 40 % NaOH and kept for 2 h at 25°C with mechanical stirring (500 rpm), maintaining the pH throughout the process. Subsequently, the mixture was centrifuged (5000 $g/4^\circ\text{C}/20$ min). The supernatant obtained was adjusted to pH 4.5 (isoelectric point) with 1N HCl and kept for 30 min. Finally, it was centrifuged at 5000 $g/4^\circ\text{C}/20$ min (Hermle, Z446K, Wehingen, Germany). The precipitate was lyophilized (Labconco, FreeZone 2.5, Kansas City, MO) at -51°C and 0.3 mBar.

Phenolic compounds that could interfere in the analyzes were removed and determined following the methodology of Carrasco-Castilla *et al.* (2012). Briefly, protein concentrate (1:10 w/v) was kept under stirring (500 rpm/4°C for 30 min) in acetone 75 % and separated by decantation 5 times. Finally, the protein concentrate was kept at room temperature until the complete removal of the solvent. The determination of total phenols was determined according to the Folin-Ciocalteu method. The results were expressed in mg GAE/g dry basis.

Enzymatic hydrolysis of chickpea proteins concentrate

Hydrolysis was performed with two different systems: Alcalase®-Flavourzyme® (Alcalase 2.4L EC 3.4.21.62; Flavourzyme EC 3.4.11.1) and Pepsin®-Pancreatin® (Pepsin EC 3.4.23.1; PP-77163, from porcine gastric mucosa, Pancreatin P-1750, porcine pancreas, 4xUSP). Briefly, the first enzyme of each system was added at time 0 and the second enzyme 60 min later. The hydrolysis parameters for each system were: protein concentration 5 % (w/v) for both systems, 50°C for Alcalase-Flavourzyme and 37°C for Pepsine-Pancreatine. For Alcalase, enzyme/substrate ratio 0.3 AU/g and pH 8.0, Flavourzyme enzyme/substrate ratio 50 LAPU/g and pH 7.0, Pepsin 4 USP/g and pH 2.0, Pancreatin 4 USP/g and pH 7.5. Aliquots of the hydrolysates were taken at 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min. Then, the enzymes were inactivated in a water bath at 80°C for 10 min, centrifuged at 5000 x g for 20 min to

separate the soluble fraction, which was lyophilized at -51°C and 0.3 mBar (Ghiribi *et al.*, 2015b).

Degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH) was determined according to the o-phthalaldehyde (OPA) method described by Nielsen *et al.* (2001). Briefly, a 10 µL aliquot (sample or standard) was placed in a 96-well plate, mixed with 200 µL of OPA reagent for 5 s and incubated for 2 min. Finally, the absorbance was measured at 340 nm in a microplate reader (ThermoLab Systems, Multiskan Spectrum, MA, USA). L-serine was used as standard. The calculation of the degree of hydrolysis was carried out by applying equations 1, 2, and 3.

$$DH (\%) = \frac{h}{htot} * 100 \quad (1)$$

Where:

DH = Degree of hydrolysis

H = Number of peptide bonds broken

htot = Total number of bonds in the substrate under study

$$h = \frac{Serine - NH2 - \beta}{\alpha} \quad (2)$$

$$Serine - NH2 = \left[\frac{Abs\ sample - Abs\ blank}{Abs\ standar - Abs\ blank} * \frac{0.9516 * V * 100}{X * P} \right] * DF \quad (3)$$

Where:

α and β are constants, 1.0 and 0.40, respectively.

V = Sample volume in liters

X = Sample weight in grams

P = Sample content expressed as a percentage

DF = Dilution factor

Ultrafiltration fractionation of chickpea proteins hydrolysate

Chickpea proteins hydrolysate that showed the highest degree of hydrolysis was fractionated in an ultrafiltration system (Millipore, Amicon 2000, Darmstadt, Germany) through ultrafiltration membranes cut-off of 10, 5, 3, and 1 kDa. The fractions were recovered and kept frozen at -21°C for further use (Millán-Linares *et al.*, 2015). The protein content of the obtained fractions was determined with the bicinchoninic acid (BCA) method using the commercial kit adapted for microplate.

Determination of anti-inflammatory activity

Cell culture

Isolation of murine peritoneal macrophages was performed according to the methodology described by Layoun *et al.* (2015). Female mice of the ICR strain were used for macrophage isolation, maintained in an adaptation period of 7 days in the biotherium conditions (22-24°C, humidity 50-55 % with a 12 h light/dark cycle). Subsequently, sterile thioglycollate was administered into the peritoneal cavity (10 % w/v), and possible behavioral changes, water, food consumption, and weight loss were monitored until sacrifice.

After 72 h, animals were sacrificed, without damaging the peritoneal cavity, and macrophages were extracted

by cold 1X phosphate-buffered saline (PBS) washes. The suspension was centrifuged at 5 min/1200 g/4°C, and the cell pellet obtained was resuspended in RPMI 1640 medium (GIBCO 31800-014) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS). For macrophage adherence, 1 mL (1x10⁶) of the cell suspension was seeded in 24-well plates. The plate was incubated for 2 h/37°C/5 % CO₂, and subsequently, the medium was removed, and 1 mL of RPMI 1640 medium supplemented with 5 % FBS was added to the control well and the treatments prepared in 5 % medium in the corresponding wells (5, 2.5, 1.25, and 0.625 mg/mL), and incubated 30 min/37°C, 5 % CO₂. Then, 10 µL of LPS (5 µg/mL) were added to each well, and the plate was incubated for 18 h/37°C, under 5 % CO₂ (Soudi *et al.*, 2013). At the end of this period, the supernatants were collected and kept frozen (-21°C) until the inflammatory mediators were determined.

Cell viability

Cell viability of murine peritoneal macrophages was determined with the sulforhodamine B (SRB) method according to Orellana and Kasinki (2016) in a microplate. Briefly, 100 µL of 1x10⁶ cells/mL in RPMI 1640 medium with 10 % FBS were placed in a 96-well plate and incubated for 2 h/37°C/5 % CO₂. Then, the medium was discarded and 100 µL of the treatments to be evaluated were added at 4 different concentrations (5, 2.5, 1.25, and 0.625 mg/mL), all diluted in RPMI 1640 medium at 5 % FBS, and the plate was incubated (18 h/37°C/5 % CO₂). After this time, 50 µL of 50 % trichloroacetic acid were added and plates incubated for 1 h at 4°C; the supernatant was discarded and the plate was washed 5 times with distilled water. Once dry, 100 µL of 0.4 % SRB were added and incubated for 30 min at room temperature in the dark. Finally, the supernatant was removed, washed 5 times with 1 % acetic acid, dried and 100 µL of 10 mM buffer tris were added. It was read at an absorbance of 492 nm. The percentage of viable cells was calculated with respect to control cells (untreated cells), considering viable cells (%) with respect to control cells (untreated cells, 100 %).

Nitric oxide (NO)

Nitrate was measured as an indicator of NO production after 18 h of induction with LPS and treatments. Briefly, in a 96-well plate, 100 µL of cell culture supernatant were placed, then 100 µL of Griess reagent (2 % sulfonyl amide and 0.1 % N-(1-naphthyl)-ethylenediamine) were added. Finally, the plate was incubated for 5 min and the absorbance was read at 540 nm. The amount of NO (µM) was calculated using a NaNO₂ standard curve (0-200 µM), $y = 0.0075x + 0.0602$ ($r^2 = 0.999$), where y = absorbance and x = nitrite concentration (µM) (Avdagić *et al.*, 2013).

Determination of TNF- α and IL-1 β

According to the manufacturer's instructions, the TNF- α concentration in cell culture supernatants was obtained using a commercial Kit (RAB0477, Sigma-Aldrich). The amount of TNF- α (pg/mL) was calculated using a TNF- α

standard curve (0-3000 pg/mL), $y = 0.0011x - 0.085$ ($r^2 = 0.9851$), where y = absorbance and x = TNF- α concentration (pg/mL). The amount of IL-1 β (RAB0274, Sigma-Aldrich) was calculated using IL-1 β standard curve (0-2000 pg/mL), $y = 0.0013x + 0.0817$ ($r^2 = 0.998$), where y = absorbance and x = IL-1 β concentration (pg/mL).

Determination of antioxidant activity

The ABTS radical-scavenging activity was determined by the method of Dinis *et al.* (1994). The absorbance was measured at 734 nm against a methanol blank. The results were expressed as % inhibition. The DPPH radical scavenging capacity was determined according to Brand-Williams *et al.* (1995) measuring the absorbance at 517 nm against a methanol blank. The results were expressed as % inhibition. The reducing power was determined by the method of Oyai-zu (1986). The absorbance was measured at 700 nm. In this method, a higher absorbance of the reaction mixture indicates a higher reducing power. The chelation capacity Cu²⁺ was determined according to Dinis *et al.* (1994). The absorbance was measured at 632 nm. The results were expressed as % inhibition.

Statistical analysis

The results were statistically analyzed using Minitab 17[®] software (State College, PA, USA). A one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey's test of comparisons with a significance level of 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Degree of chickpea proteins hydrolysis

The hydrolysis of chickpea proteins was carried out from the concentrate with a protein content of 79.92 ± 1.77 %. The kinetics of the proteolytic reaction with the two-enzyme systems Alcalase-Flavourzyme (A-F) and Pepsin-Pancreatin (P-P) is presented in Figure 1.

The P-P enzyme system showed a degree of hydrolysis of 33.18 % at 180 min. This result agrees with that reported by Torres-Fuentes *et al.* (2011) who obtained a degree of hydrolysis of 32 %. The degree of hydrolysis obtained from the A-F system was 63.31 % at 150 min, similar to that reported by Yust *et al.* (2012) with a degree of hydrolysis of 65 % for chickpea protein with a sequential system of Alcalase[®]-Flavourzyme[®] for 150 min. The maximum degree of hydrolysis (63.31 %) was reached with the A-F system at a time of 150 min since at 180 min there was a decrease (53.81 %). Torres-Fuentes *et al.* (2011) reported a similar trend in the degree of hydrolysis generated by the Pepsin[®]-Pancreatin[®] enzymatic system, they obtained 31.5 % after 325 min, however, at the end of hydrolysis (360 min) they reported a 27 % for the hydrolyzed chickpea protein. This was probably due to the plastein reaction, which is a series of reactions catalyzed by proteases that condense peptides, so that peptide fragments of hydrolysates can join together forming polypeptides, resulting in high molecular weight proteins (Torres-Fuentes *et al.*, 2011; Udenigwe and Rajendran, 2016).

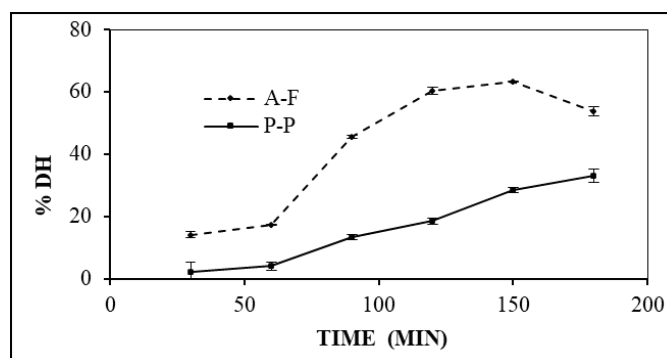


Figure 1. Degree of hydrolysis (DH) obtained by the Alcalase-Flavourzyme (A-F) and Pepsin-Pancreatin (P-P) enzymatic systems. Results represent the mean of three independent determinations \pm SD.

Figura 1. Grado de hidrólisis (DH) obtenido por los sistemas enzimáticos Alcalasa-Flavourzima (A-F) y Pepsina-Pancreatina (P-P). Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm DE.

On the other hand, several studies report that the use of enzymes individually generates a degree of hydrolysis <30 %. Ghribi *et al.* (2015b) obtained a 14.67 % hydrolysis from Alcalase[®] after 120 min, while Torres-Fuentes *et al.* (2011) reported 16.3 % with the enzyme Pancreatin[®] at 180 min. Therefore, using two enzymes for protein hydrolysis is more effective in producing extensive hydrolysates (>50 %) (Yust *et al.*, 2012). The use of the A-F enzyme system produced an extensive hydrolysate due to the Alcalase[®] enzyme, which, being an endopeptidase, influences the tertiary and quaternary conformations of the protein by breaking the peptide bonds (preferably hydrophobic amino acids) within the individual proteins or aggregates to produce small peptides and thus perform a pre-digestion. This, in turn, increases the number of N-terminal sites, thereby facilitating hydrolysis with the Flavourzyme[®] enzyme, which is a complex of proteases from *Aspergillus oryzae* with endopeptidase and exopeptidase activity, resulting in high degrees of hydrolysis within 150 min (Ghribi *et al.*, 2015b; Nasri, 2016; Tacias-Pascacio *et al.*, 2020).

The degree of hydrolysis depends on the conditions used, the nature of the enzyme and its enzyme-substrate concentration, hydrolysis time, temperature, and pH. Likewise, these parameters affect the peptide structure in terms of size, composition, and amino acid sequence, which determines the bioactivity of the peptides. Therefore, high levels of proteolysis are desirable (>50 %) since extensive hydrolysate is necessary to obtain various bioactive peptides for medical or dietary applications (Agyei *et al.*, 2016; Nasri, 2016).

On the other hand, studies have reported that the antioxidant activity presented by peptides obtained from hydrolyzed chickpea protein is higher in peptides with low molecular weight presenting sequences like ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH, and SAEHGSLH (Torres-Fuentes *et al.*, 2011; Torres-Fuentes *et al.*, 2015), which is related to the time used in hydrolysis. Megías *et al.* (2007) reported peptides from chickpea hydrolyzed protein with Alcalase[®]-Flavourzyme[®] enzymes for 10 min and showed low chelating activity, while peptides purified from 100 min hydrolysates with the same enzymes showed high chelating activity. This indicates that

a longer hydrolysis time can generate peptides with lower molecular weights that presents major antioxidant activity.

Enzymatic hydrolysis is the most preferred method over others since chemical hydrolysis has the disadvantage of destroying some amino acids and has a difficult reproducibility since the broken bonds are not specific. Likewise, microbial hydrolysis is not suitable as it produces low-yield peptides that are sometimes used as a source for the growth of the same microorganism (Nasri, 2016).

Based on the above, hydrolysis performed with the Alcalase®-Flavourzyme® system for 150 min is the most suitable method to obtain extensive chickpea proteins concentrate hydrolysates with a degree of hydrolysis greater than 50 %, so that the concentrate can be a source of low molecular weight bioactive peptides that can present biological activities such as anti-inflammatory and antioxidant.

Cell viability

Although bioactive peptides possess biological activities, there is a possibility of a cytotoxic effect, so it is necessary to evaluate the harmful effects (Sarmadi and Ismail, 2010). The SRB method is characterized as fast, sensitive and inexpensive, so it was used to determine the cytotoxic effect of the 4 fractions obtained from hydrolyzed chickpea proteins at 4 different concentrations (5, 2.5, 1.25, and 0.625 mg/mL).

Figure 2 shows that the F<1 kDa fraction generated the lowest viability (76.3 %) at a concentration of 5 mg/mL, however, this fraction did not show a significant difference in any of its concentrations. In contrast, the rest of the fractions (F5-10 kDa, F3-5 kDa, and F1-3 kDa) did not decrease viability at any of the concentrations used. Therefore, for NO, TNF- α , and IL-1 β determinations, only the 5-10 kDa, F3-5 kDa, and F1-3 kDa fractions were evaluated. F<1 kDa fraction was not evaluated since it showed a decrease in the viability of murine peritoneal macrophages.

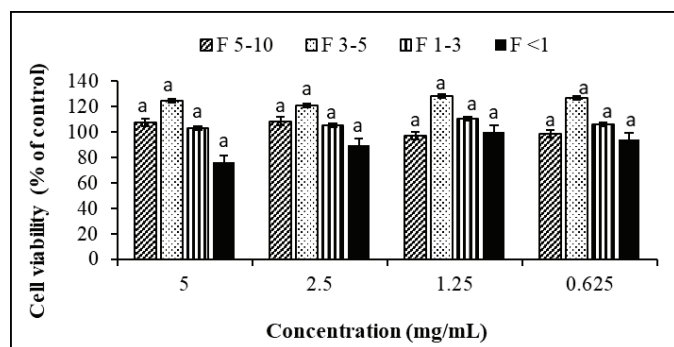


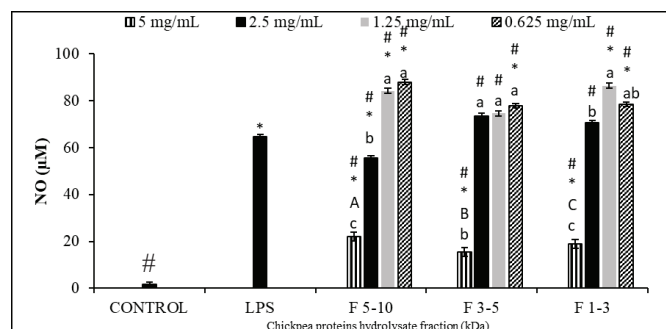
Figure 2. Cell viability of the 4 fractions obtained from the hydrolyzed chickpea protein at different concentrations (5, 2.5, 1.25, and 0.625 mg/mL). Results represent the mean of three independent determinations \pm SD. Values that do not share the same lowercase letter within the same fraction are significantly different ($p < 0.05$).

Figura 2. Viabilidad celular de las 4 fracciones obtenidas de la proteína hidrolizada de garbanzo en sus diferentes concentraciones (5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg/mL). Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm DE. Los valores que no comparten la misma letra minúscula dentro de la misma fracción son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Determination of NO

Nitrate was measured as an indicator of NO production since it plays a crucial role in the inflammatory process, so its inhibition may help regulate inflammation (Ndiaye *et al.*, 2012). As shown in Figure 3, LPS stimulated NO synthesis compared to the control group (macrophages without LPS and without treatment). The three fractions obtained from chickpea proteins hydrolysate showed NO production inhibition. The F3-5 kDa fraction showed the lowest amount of NO (15.41 μ M) at a 5 mg/mL concentration, followed by the F1-3 kDa (22 μ M) and F5-10 kDa (18.81 μ M) fractions. The above indicates that the 3-5 kDa fraction presented the highest percentage of NO inhibition (76 %) with respect to the cells stimulated with LPS, at a 5 mg/mL concentration. These results are similar to those reported by López-Barrios *et al.* (2016), of a 73 % NO inhibition from a black bean germinated protein hydrolysate.

The reduction in the inhibition of NO synthesis observed could be due to the ability of the peptides contained in the chickpea proteins hydrolysate fractions to inhibit the expression of the inducible nitric oxide synthetase enzyme (González-Montoya *et al.*, 2018), which is responsible for oxidizing the amino acid L-arginine into L-citrulline and thus the expression of NO, which is a mediator of inflammation mainly synthesized by macrophages (Huang *et al.*, 2016). However, when this is found at high concentrations is considered cytotoxic, leading to molecular damage that can generate a continuous state of inflammation which is related to several



#Representa diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. *Representa diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al LPS.

Figure 3. Effect of the three peptide fractions obtained from the hydrolyzed chickpea protein on the inhibition of NO in LPS-activated murine peritoneal macrophages. Results represent the mean of three independent determinations \pm SD. Values that do not share the same lowercase letter within the same fraction are significantly different ($p < 0.05$). Values that do not share the same capital letter between fractions are significantly different ($p < 0.05$).

Represents significant difference ($p < 0.05$) with respect to control group. * Represents significant difference ($p < 0.05$) with respect to LPS group.

Figura 3. Efecto de las tres fracciones peptídicas obtenidas a partir de la proteína de garbanzo hidrolizada sobre la inhibición del NO en macrófagos peritoneales murinos activados por LPS. Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm DE. Los valores que no comparten la misma letra minúscula dentro de la misma fracción son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los valores que no comparten la misma letra mayúscula entre fracciones son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

diseases including chronic inflammatory ones (Ndiaye *et al.*, 2012), therefore, inhibiting NO synthesis can help to control the acute or chronic inflammatory response.

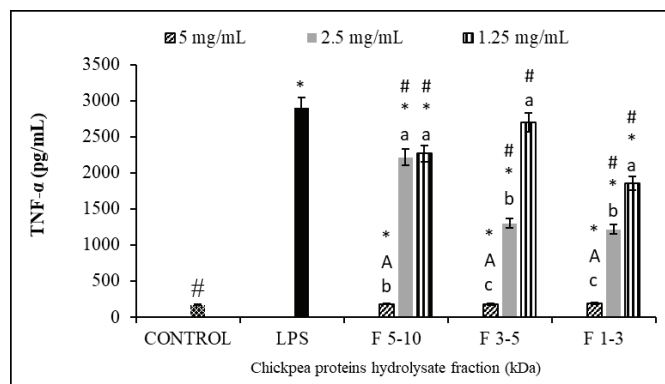
On the other hand, it has been reported that peptides obtained from germinated and hydrolyzed chickpea proteins have molecular weights between 1.1-2.3 kDa, and sequences of 10-22 amino acids have shown inhibition of NO production in RAW 264.7 macrophages activated by LPS (Milán-Noris *et al.*, 2018). However, molecular weight is not the only factor that is related to the biological activities presented by the peptides obtained from legume proteins (Nasri, 2016), so the NO synthesis inhibitory activity shown by the peptides present in the 3-5 kDa proteins hydrolysate fraction in the present study, can be attributed to the amino acids present, their sequence or their charge.

Determination of TNF- α and IL-1 β .

IL-1 β together with TNF- α are considered the main mediators of the biological response to LPS (García-Lafuente *et al.*, 2014). Thus, inhibition of the expression of these inflammatory mediators may be a strategy to control the inflammatory response in chronic conditions, and thus be able to contribute to the treatment of chronic inflammatory diseases. After stimulation with LPS, TNF- α production was determined in the different groups. The F3-5 kDa fraction at 5 mg/mL, induced the lowest amount (179.5 pg/mL) of TNF- α followed by F5-10 kDa (185.69 pg/mL) and F1-3 kDa (192.27 pg/mL). Therefore, the F3-5 kDa fraction presented the highest percentage of inhibition (93 %) with respect to the LPS group (Figure 4). These results are similar to those reported by Vernaza *et al.* (2012) for a soy protein hydrolysate that presented a 98 % inhibition of TNF- α .

In the case of IL-1 β (Figure 5), LPS stimulated the production of IL-1 β compared to the control. The 3 fractions presented inhibition of this interleukin, however, F1-3 kDa and F3-5 kDa fractions showed the highest inhibition (87 and 90 %) with respect to LPS-stimulated cells. These results are higher than those reported by Ndiaye *et al.* (2012) who obtained 80 % inhibition of IL-1 β synthesis in LPS-activated macrophages with a pea protein hydrolysate.

Studies have reported that, anti-inflammatory peptides have a wide range of molecular weights (0.3-14 kDa) (Día *et al.*, 2009; Millán-Linares *et al.*, 2015; Ndiaye *et al.*, 2012). Likewise, peptides have been found to be rich in glutamine and serine from germinated and hydrolyzed soybean and chickpea proteins which presented anti-inflammatory activity (González-Montoya *et al.*, 2018; Milán-Noris *et al.*, 2018). Although the possible relationship of the amino acids present in peptides with their anti-inflammatory activity has not yet been defined, some studies have reported peptides that inhibit the action of COX-2, iNOS enzymes and other inflammatory mediators such as PGE₂, CCL₂, among others (Milán-Noris *et al.*, 2018; Millán-Linares *et al.*, 2015; Oseguera-Toledo *et al.*, 2011). In the present study, F3-5 kDa fraction presented the highest inhibition in the synthesis of cytokines TNF- α and IL-1 β , which are produced in various cells inclu-

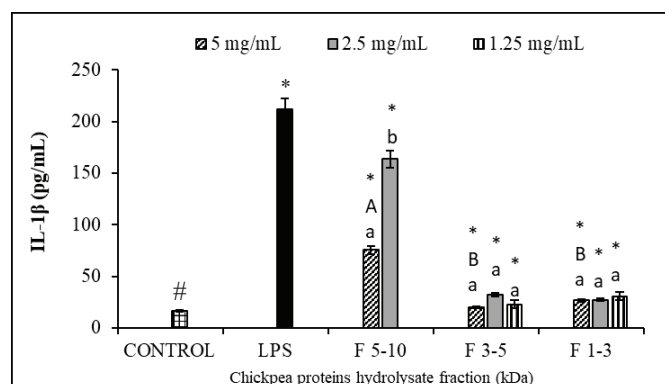


#Representa diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control.
*Representa diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al LPS.

Figure 4. Effect of peptide fractions (F5-10, F3-5 and F1-3 kDa) obtained from the hydrolyzed chickpea protein (5, 2.5, and 1.25 mg/mL), on the inhibition of TNF- α in LPS-activated murine peritoneal macrophages. Results represent the mean of three independent determinations \pm SD. Values that do not share the same lowercase letter within the same fraction are significantly different ($p < 0.05$). Values that do not share the same capital letter between fractions are significantly different ($p < 0.05$).

Represents significant difference ($p < 0.05$) with respect to control group.
* Represents significant difference ($p < 0.05$) with respect to LPS group.

Figura 4. Efecto de las fracciones peptídicas (F5-10, F3-5 y F1-3 kDa) obtenidas a partir de la proteína hidrolizada de garbanzo (5, 2.5 y 1.25 mg/mL) sobre la inhibición de TNF- α en macrófagos peritoneales murinos activados por LPS. Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm DE. Los valores que no comparten la misma letra minúscula dentro de la misma fracción son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los valores que no comparten la misma letra mayúscula entre fracciones son significativamente diferentes ($p < 0.05$).



#Representa diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control.

*Representa diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al LPS.

Figure 5. Effect of the peptide fractions (F5-10, F3-5, and F1-3 kDa) obtained from the hydrolyzed chickpea protein (5, 2.5, and 1.25 mg/mL), on the inhibition of IL-1 β in LPS-activated murine peritoneal macrophages. Results represent the mean of three independent determinations \pm SD. Values that do not share the same lowercase letter within the same fraction are significantly different ($p < 0.05$). Values that do not share the same capital letter between fractions are significantly different ($p < 0.05$).

Represents significant difference ($p < 0.05$) with respect to control group.
* Represents significant difference ($p < 0.05$) with respect to LPS group.

Figura 5. Efecto de las fracciones peptídicas (F5-10, F3-5 y F1-3 kDa) obtenidas a partir de la proteína hidrolizada de garbanzo (5, 2.5 y 1.25 mg/mL) en la inhibición de IL-1 β en macrófagos peritoneales murinos activados con LPS. Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm DE. Los valores que no comparten la misma letra minúscula dentro de la misma fracción son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los valores que no comparten la misma letra mayúscula entre fracciones son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

ding macrophages and are expressed by the action of different stimuli such as LPS (Montoya-Rodríguez *et al.*, 2014). However, the mechanisms through which the chickpea proteins hydrolysate fractions act by inhibiting the production of pro-inflammatory mediators (IL-1 β and TNF- α) are still unknown. Nevertheless, studies carried out using proteins from legumes such as bean and soybean have reported the inhibition of inflammation through the suppression of the NF- κ B pathway (Dia *et al.*, 2009; Oseguera-Toledo *et al.*, 2011). Therefore, the chickpea proteins hydrolysate fractions evaluated in the present study possibly carry out their function in a similar way.

Determination of the antioxidant activity of chickpea protein hydrolysate fractions

During inflammation, cells such as macrophages and neutrophils generate ROS to help destroy foreign agents, however, although these play an important role in immune defense, they are highly unstable and react rapidly with other groups and damage other biological molecules such as DNA, proteins, and lipids, resulting in cellular or tissue injury (Chen *et al.*, 2018). In addition, excessive ROS generation has been linked to chronic inflammation, so the use of antioxidants, such as bioactive peptides with these properties, could help to neutralize these reactive oxygen species (Zhang *et al.*, 2011). Due to the various antioxidant action reported for bioactive peptides, several methods were used to have a broader view on the antioxidant potential, for this purpose four methods with different mechanisms of action were applied.

The fractions with the highest ABTS⁺ radical inhibition were F1-3 kDa and F3-5 kDa (78 and 75 %) followed by F \leq 1 kDa and F5-1 kDa (Table 1). These results agree with that reported by Ngoh and Gan (2016) who obtained a peptide fraction from beans with molecular weight <3 kDa, which showed the highest percentage of ABTS⁺ radical inhibition compared to other fractions with higher molecular weight. Likewise, the results show that the four fractions presented greater ABTS⁺ radical inhibition compared to the chickpea

protein concentrate with (CCF) and without phenolics (CSF), similar to that reported by Arcan and Yemenicioglu (2010) who found that the chickpea protein hydrolysate has greater inhibition of this radical (1.9 times more) compared to the chickpea protein extract. The above may be due to abundant hydrophobic and hydrophilic amino acid residues present in peptides that are part of the peptide fractions with molecular weights <3 kDa obtained by ultrafiltration (Ngoh and Gan, 2016).

The fraction with the highest DPPH⁺ radical inhibition percentage was F1-3 kDa (7.76 %) followed by F<1 kDa, F3-5 kDa, and F5-10 kDa. These results are similar to those obtained by Yu *et al.* (2018) who reported the highest DPPH⁺ inhibition for the fraction with molecular weights between 1-3 kDa obtained from hydrolyzed soy protein isolate. These authors reported the same behavior in terms of the order of radical inhibition percentage by the four fractions (F1-3 kDa, F <1 kDa, F3-5 kDa, F5-10 kDa). The results obtained are similar to those reported for peptide fractions with molecular weight <3 kDa obtained from hydrolyzed soybean and mung bean protein, which showed the highest percentage of DPPH⁺ radical inhibition (Zhang *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2019).

On the other hand, studies have reported peptides obtained from hydrolyzed chickpea protein with very low molecular weights (0.3, 0.4, 0.7, and 1.1 kDa) and sequences ranging from 3-10 amino acid residues, which exhibit DPPH⁺ radical inhibition (Zhang *et al.*, 2011; Ghribi *et al.*, 2015b). However, the antioxidant activity is not only attributed to the molecular weight presented by the peptides, since this also seems to be strongly related to the amino acid composition and sequence, conformation, and hydrophobicity. Hydrophobic amino acids such as Phe, Ala, Pro, Val, Gly, and Ile and non-hydrophobic amino acids such as His, Tyr, Gln, Arg, Asp, and Ser have been found in peptides obtained from hydrolyzed chickpea protein which show DPPH⁺ radical inhibition capacity, being His and Arg found in almost all the sequences of these peptides; likewise, Asp, Gln, Arg, Pro, Gly, and Ile are terminal amino acids in these peptides (Zhang *et al.*, 2011; Ghribi *et al.*, 2015b; Rizzello *et al.*, 2016). The antioxidant activity of these peptides is attributed in the case of aromatic amino acids to the fact that they convert free radicals into stable molecules by donating electrons, while these amino acids maintain their stability through their resonance structure; similarly, in the case of Asp, is due to the carboxyl group that it presents in its side chains, and for hydrophobic amino acids such as Gly to which is an H⁺ donor (Ghribi *et al.*, 2015b). So, the hydrolysis of chickpea proteins possibly generated peptides that could react with free radicals to convert them into more stable products and prevent their chain reaction.

The Fe³⁺ ion reducing power is used to evaluate the ability of an antioxidant to donate an electron to a free radical and convert it into a more stable component (Li *et al.*, 2008). The fraction with the highest reducing power was F1-3 kDa (0.508Abs700nm), followed by F<1 kDa, F3-5 kDa, and F5-10 kDa. These results are similar to those reported by Zhang *et al.* (2018) who obtained fractions with molecular weight

Table 1. Antioxidant capacity of chickpea proteins concentrate and fractions obtained from enzymatic hydrolysis.

Cuadro 1. Capacidad antioxidante del concentrado proteico de garbanzo y las fracciones obtenidas por hidrólisis enzimática.

Sample	ABTS ⁺ % Inhibition	DPPH ⁺ % Inhibition	Reducing power Fe ³⁺ Abs (700 nm)	Chelating activity Cu ²⁺ % Inhibition
CCF	22.27 ± 0.41c	6.42 ± 0.35c	0.217 ± 0.01d	2.48 ± 1.28e
CSF	10.12 ± 0.08d	7.29 ± 0.32ab	0.172 ± 0.02d	2.42 ± 1.37e
Fractions (kDa)				
F5-10	64.50 ± 2.80b	5.22 ± 0.21d	0.369 ± 0.04c	40.75 ± 0.85d
F3-5	74.80 ± 1.24a	6.51 ± 0.37bc	0.437 ± 0.03b	43.05 ± 0.20c
F1-3	78.00 ± 0.28a	7.76 ± 0.28a	0.508 ± 0.01a	48.49 ± 0.60b
F<1	67.80 ± 1.26b	6.88 ± 0.21bc	0.457 ± 0.03ab	52.60 ± 0.44a

CCF = Concentrate with phenolics, CSF = Concentrate without phenolics. Values represent means ± SD. Values that do not share the same letter per column are significantly different (p<0.05). * Fractions (5 mg/mL) were obtained from CSF.

<3 kDa from hydrolyzed mung bean and soybean protein, respectively, which presented the highest reducing power compared to other fractions with higher molecular weight.

The increase in absorbance of the reaction mixture (hydrolysate fraction) is related to the increase in reducing power, furthermore, it is observed (Table 1) that the four fractions presented higher reducing power compared to CCF and CSF. These results are similar to those obtained by Yust *et al.* (2012) who reported that chickpea protein hydrolysate presented better reducing power (2.16 times more) compared to chickpea protein concentrate.

On the other hand, Torres-Fuentes *et al.* (2015) reported peptides that presented Fe³⁺ reducing power, obtained from hydrolyzed chickpea protein with molecular weights between 0.4-1.3 kDa and constituted by 4-11 amino acid residues including Ala, Leu, Glu, Pro, Asp, His, Arg, Thr, Tyr, Asn, Phe, Val, Ser, and Gly, being Pro, Glu and His the most frequently appearing ones; besides, Ala, Arg, Thr, Leu, Phe and His are terminal amino acids in these peptides. Thus, the fractions evaluated possibly contain some peptides that have amino acids that present donor electrons and can react with free radicals to convert them into more stable products and terminate the radical chain reaction (Li *et al.*, 2008).

Transition metal ions such as Cu²⁺ and Fe²⁺ can catalyze the generation of reactive oxygen species through Fenton reactions, resulting in lipid peroxidation and DNA damage (Real-Hernández and González de Mejía, 2019). Likewise, it can catalyze the Haber-Weiss reaction and induce the formation of superoxide anions to form more dangerous hydroxyl radicals, which react with adjacent biomolecules to cause severe tissue damage (Adegbola *et al.*, 2020). Therefore, the chelation of transition metal ions by peptides would delay the oxidation reaction, preventing the appearance of diseases such as neurodegenerative, cardiovascular, cancer, among others (Zhang *et al.*, 2011).

Table 1 shows that the fraction that obtained the highest percentage of Cu²⁺ inhibition was F≤1 kDa (52.60 %), followed by F1-3 kDa, F3-5 kDa, and F5-10 kDa. These results are similar to those reported by Torres-Fuentes *et al.* (2011) for the fraction obtained from hydrolyzed chickpea protein.

On the other hand, low molecular weight peptides obtained from hydrolyzed chickpea protein with Cu²⁺ chelating capacity have been reported; these peptides present certain amino acids to which this capacity is attributed. Arcan and Yemenicioglu (2007) reported that some amino acids that present metal-chelating antioxidant activity are Lys, Arg, Asp, Glu, and His, likewise, Megías *et al.* (2007) obtained peptides that present His and Arg. Torres-Fuentes *et al.* (2011) reported peptide fractions with molecular weights between 0.1-1.2 kDa with 5-11 amino acid residues that are rich in Arg, Ser, and Lys. Zhang *et al.* (2011) obtained a peptide with a molecular weight 0.7 kDa and 5 amino acid residues (Asn, Arg, Tyr, His, and Glu).

In these studies, the antioxidant activity is attributed to the amino acid His due to the ability of the imidazole ring (which it possesses) to act as an H⁺ donor, likewise, Arg may

show antioxidant activity due to its guanidino group (Arcan and Yemenicioglu, 2007). Finally, Ghribi *et al.* (2015b) reported chickpea protein hydrolysates rich in amino acids such as Glu, Asp, and Arg, so that, as these amino acids are found in higher amounts with respect to others, and it is possible that the fractions obtained from hydrolyzed chickpea protein presented antioxidant activity since amino acids found in these fractions, are reported to have ABTS⁺ and DPPH⁺ radical scavenging capacity, iron-reducing power and metal chelating capacity. Other factors influence the antioxidant and biological activity of peptides, as these can be affected by the conditions used to obtain the protein concentrate, the degree of hydrolysis, the type of protease used, the structure and concentration of the peptide (Sarmadi and Ismail, 2010).

CONCLUSIONS

The combined use of the Alcalase-Flavourzyme enzymes generate extensive proteins hydrolysate that presented a higher antioxidant capacity than the protein concentrate. Of the four proteins hydrolysate fractions obtained by ultrafiltration, the first three presented anti-inflammatory capacity, inhibiting the production of NO, TNF-α and IL-1β. Furthermore, all fractions showed antioxidant capacity for the ABTS, DPPH, Fe³⁺ ion reducing capacity, and Cu²⁺ chelating capacity methods. This work demonstrates that it is possible to obtain peptides with anti-inflammatory and antioxidant activity from chickpea proteins hydrolysates. Nevertheless, it is important to consider that the fractions obtained from chickpea hydrolysate can contain other compounds that contribute or generate possible anti-inflammatory and antioxidant activity. Chickpea not only presents nutritional qualities such as its adequate protein content, but also biological activities, so it can be considered as a source of bioactive compounds that can be used as alternative therapies for certain diseases related to chronic inflammation. However, it is necessary that the peptide fractions obtained that presented the highest anti-inflammatory and antioxidant activity are sub-fractionated and characterized to identify the peptides responsible for these activities.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN-ENCB).

ETHICS APPROVAL

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

REFERENCES

- Adegbola, P.I., Adetutu, A. and Olaniyi, T.D. 2020. Antioxidant activity of *Amaranthus* species from the Amaranthaceae family-A review. *South African Journal of Botany*. 133: 111-117.
- Ageyi, D., Ongkudon, C.M., Wei, C.Y., Chan, A.S. and Danquah, M.K. 2016. Bioprocess challenges to the isolation and

- purification of bioactive peptides. *Food and Bioproducts Processing*. 98: 244-256.
- Arcan, I. and Yemenicioglu, A. 2007. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*. 103: 301-312.
- Arcan, I. and Yemenicioglu, A. 2010. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. *Food Research International*. 43: 140-147.
- Avdagić, N., Začiragić, A., Babić, N., Hukić, M., Seremet, M., Lepara, O. and Nakaš-Lčindić, E. 2013. Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 13: 5-9.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.M. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*. 28: 25-30.
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A.J., Jiménez-Martínez, C., Jacinto-Hernández, C., Alaíz, M., Jirón-Calle, J., Vioque, J. and Dávila-Ortíz, G. 2012. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chemistry*. 131: 1157-1164.
- Chen, Z., Li, W., Santhanam, R.K., Wang, C., Gao, X., Chen, Y., Wang, C., Xu, L. and Chen, H. 2018. Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] byproduct: Isolation, identification and molecular docking study. *European Food Research and Technology*. 245: 677-689.
- Daliri, E. B. M., Oh, D. H. and Lee, B. H. 2017. Bioactive peptides. *Foods*. 6: 2-21.
- Dia, V. P., Wang, W., Oh, V. L., de Lumen, B. O. and González de Mejía, E. 2009. Isolation, purification and characterization of lunasin from defatted soybean flour and in vitro evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*. 114:108-115.
- Dinis, T., Madera, V. and Almeida, L. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-amino sacylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation, and as peroxil radical scavengers. *Archives Biochemistry Biophysics*. 315: 161-169.
- Elshafei, A. M. 2020. When oxygen can be toxic? A mini review. *Journal of Applied Life Sciences International*. 23: 1-9.
- Ercan, P. and Neheir, S. 2016. Inhibitory effects of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase, alpha-amylase and alpha-glucosidase. *Food Chemistry*. 205: 163-169.
- García-Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo-Ruiz, A., Villares, A., Guillamón, E., Rostagno, M. and Mateo-Vivaracho, L. 2014. *In vitro* anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chemistry*. 161: 216-223.
- Ghribi, M.A., Gafsi, M.I., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougatef, A. and Besbes, S. 2015a. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*. 187: 322-330.
- Ghribi, M.A., Sila, A., Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N., Makhlouf, I., Blecker, C., Attia, H., Dhulster, P., Bougatef, A. and Besbes, S. 2015b. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *Journal of Functional Foods*. 12: 512-525.
- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J. M., Mora-Escobedo, R. and Martínez-Villaluenga, C. 2018. Peptides derived from *in vitro* gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry*. 242: 75-82.
- Guo, Y., Zhang, T., Jiang, B., Miao, M. and Mu, W. 2014. The effects of an antioxidative pentapeptide derived from chickpea protein hydrolysates on oxidative stress in Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of Functional Foods*. 7: 719-726.
- Hassan-Ahmed, L. E., Dahham, S. S., Fadul, S. M., Umar, M. I., Abdul Majid, S. A., Khaw, K. Y. and Abdul Majid, A. M. S. 2016. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of (-)-pseudosemiglabrin, a major phytoconstituent isolated from *Tephrosia apollinea* (Delile) DC. *Journal of Ethnopharmacology*. 193: 312-320.
- Huang, M., Lin, J., Lu, K., Xu, H., Geng, Z., Sun, P. and Chen, W. 2016. Anti-inflammatory effects of Cajaninstilbene acid and derivatives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 64: 2893-900.
- Layoun, A., Samba, M. and Santos, M.M. 2015. Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon toll-like receptors stimulation. *Journal of Visualized Experiments*. 1: 1-5.
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. and Lui, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 106: 444-450.
- Li, K.K., Zhou, X., Wong, H.L., Ng, F., Fu, W. M., Leung, P.C. and Ko, C.H. 2016. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effects of Zao-Jiao-Ci (the spine of *Gleditsia sinensis* Lam.) aqueous extract and its mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*. 192: 192-200.
- López-Barrios, L., Antunes-Ricardo, M. and Gutiérrez-Urbe, J. 2016. Changes in antioxidant an anti-inflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chemistry*. 1: 417-424.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M., Girón-Calle, J., Alaiz, F., Millan, N. and Vioque, J. 2007. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 55: 3949-3954.
- Mieszkowska, A. and Marzec, A. 2016. Effect of polydextrose and inulin on texture and consumer preference of short-dough biscuits with chickpea flour. *LWT-Food Science and Technology*. 73: 60-66.
- Milán-Noris, A. K., Gutiérrez-Urbe, J. A., Santacruz, A., Serna-Saldívar, S. O. and Martínez-Villaluenga, C. 2018. Peptides and isoflavones in gastrointestinal digests contribute to the anti-inflammatory potential of cooked or germinated desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chemistry*. 268: 66-76.
- Millán-Linares, M.C., Millán, F., Pedroche, J. and Yust, M. 2015. GPETAFLR: A new anti-inflammatory peptide from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*. 18: 358-367.
- Mondor, M., Aksay, S., Drolet, H., Roufik, S., Farnworth, E. and Boye, J. 2009. Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 342-347.

- Montoya-Rodríguez, A., de Mejía, E. G., Dia, V. P., Reyes-Moreno, C. and Milán-Carrillo, J. 2014. Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF-κB signaling. *Molecular Nutrition and Food Research*. 58:1028-1041.
- Nasri, M. 2016. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. *Advances in Food and Nutrition Research*. 81: 109-159.
- Ndiaye, F., Vuong, T., Duarte, J., Aluko, R. and Matar, C. 2012. Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow fields peas seeds. *European Journal of Nutrition*. 51: 29-37.
- Ngoh, Y.Y. and Gan, C.Y. 2016. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α-amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*. 190: 331-337.
- Nielsen, P., Peterse, D. and Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66: 642-646.
- Orellana E.A. and Kasinski, A.L. 2016. Sulforhodamine B (SRB) Assay in cell culture to investigate cell proliferation. *Bio Protoc*. 1: 6.
- Oseguera-Toledo, M. E., González De Mejía, E., Dia, V. P. and Amaya-Llano, S. L. 2011. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF-κB pathways. *Food Chemistry*. 127: 1175-1185.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepare from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307-315.
- Real-Hernandez, L. M. and Gonzalez de Mejia, E. 2019. Enzymatic production, bioactivity, and bitterness of chickpea (*Cicer arietinum*) peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18: 1913-1946.
- Rizzello, C., Tagliacozzi, D., Babini, E., Rutella, G., Saa, D. and Gianotti, A. 2016. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*. 27: 549-569.
- Rizzo, G. 2020. The antioxidant role of soy and soy foods in human health. *Antioxidants*. 9: 635.
- Samaei, S. P., Ghorbani, M., Tagliacozzi, D., Martini, S., Gotti, R., Themelis, T. Tesini F., Gianotti, A., Toschi, T.G. and Babini, E. 2020. Functional, nutritional, antioxidant, sensory properties and comparative peptidomic profile of faba bean (*Vicia faba*, L.) seed protein hydrolysates and fortified apple juice. *Food Chemistry*. 127120.
- Sarmadi, B.H. and Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31: 1949-1956.
- Sharma, S., Singh, R. and Rana, S. 2011. Bioactive peptides: A review. *International Journal Bioautomation*. 15: 223-250.
- Shi, W., Hou, T., Guo, D. and He, H. 2019. Evaluation of hypolipidemic peptide (Val-Phe-Val-Arg-Asn) virtual screened from chickpea peptides by pharmacophore model in high-fat diet-induced obese rat. *Journal of Functional Foods*. 54: 136-145.
- Sies, H. and Jones, D. P. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1: 1-21.
- Soudi, S., Zavarán-Hosseini, A., Muhammad-Hassan, Z., Soleimani, M., Jamshidi-Adegani, F. and Mahmoud-Hashemi, S. 2013. Comparative Study of the effect of LPS on the function of BALBc and C57BL/6 peritoneal macrophages. *Cell J*. 15: 45-54.
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á. and Fernandez-Lafuente, R. 2020. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 165: 2143-2196.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M. and Vioque, J. 2011. Affinity purification and characterization of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 129: 485-490.
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M. M., Recio, I., Alaiz, M. and Vioque, J. 2015. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 180: 194-202.
- Udenigwe, C. C. and Rajendran, S. R. C. K. 2016. Old products, new applications? Considering the multiple bioactivities of plastein in peptide-based functional food design. *Current Opinion in Food Science*. 8: 8-13.
- Vernaza, M.G., Dia, P.V., Gonzalez de Mejia, E. and Chang, K.Y. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*. 134: 2217-2225.
- Wali, A., Mijiti, Y., Yanhua, G., Yili, A., Aisa, H. A. and Kawuli, A. 2020. Isolation and identification of a novel antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprout protein hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 27: 219-227.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y. and Ma, H. 2020. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 105: 308-322.
- Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T. and Lin, L. 2019. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from mung bean (*Vigna radiate*). *Food Chemistry*. 270: 243-250.
- Yu, M., He, S., Tang, M., Zhang, Z., Zhu, Y. and Sun, H. 2018. Antioxidant activity and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of soybean meal hydrolysate. *Food Chemistry*. 243: 249-257.
- Yust, M.M., Millán-Linares, M.C., Alcaide-Hidalgo, J.M., Millán, F. and Pedroche, J. 2012. Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 92: 1994-2001.
- Zhang, Q., Tong, X., Sui, X., Wang, Z., Qi, B., Li, Y. and Jiang, L. 2018. Antioxidant activity and protective effects of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Food Research International*. 111: 256-264.
- Zhang, T., Li, Y. and Miao, J. 2011. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 128: 28-33.

Evaluation of an antioxidant diet for tilapia *Oreochromis niloticus* with mango and roselle by-products inclusion

Evaluación de una dieta antioxidante para tilapia *Oreochromis niloticus* con inclusión de subproducto de mango y jamaica

Concepción-Brindis A¹, Jiménez-Ruiz EI^{2*}, Sumaya-Martínez MT², Rincones-López JE³, Sánchez-Herrera LM², Peraza-Gómez V⁴, Enedina-Medina-Carrillo R⁵, Spanopoulos-Hernández M⁶

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Carretera Tepic-Compostela km 9, C.P. 63780, Xalisco, Nayarit, México.

² Unidad de Tecnología de Alimentos, Secretaría de Investigación y Posgrado, Universidad Autónoma de Nayarit, Ciudad de la Cultura s/n, C.P. 63000, Tepic, Nayarit, México. E

³ Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Carretera Tepic-Compostela km 9, C.P. 63780, Xalisco, Nayarit, México.

⁴ Unidad Académica Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Universidad Autónoma de Nayarit, Carretera a San Blas km. 12, C.P. 63740, Bahía de Matanchén, San Blas, Nayarit, México.

⁵ Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit, Ciudad de la Cultura s/n, 63000 Tepic, Nayarit, México.

⁶ Instituto Tecnológico de Mazatlán, Corsario 1 # 203 Col. Urias, C.P. 82070, Mazatlán Sinaloa, México.

ABSTRACT

The aquaculture industry experiences a growing interest in implementing antioxidants from natural origin in diets because the synthetic ones are associated to carcinogenic and teratogenic effects. Additionally, synthetic antioxidants have been included in such diets to prevent lipid oxidation during storage and distribution, without a perspective of the organisms health, since they require micronutrients, such as bioactive compounds, mainly antioxidants. Thus, mango and roselle by-products (rich in bioactive compounds) were included in an aquaculture diet, assessed on its antioxidant properties by distincts technics: antiradical activity 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH●), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and phenolic compounds concentration. In addition, with this feed, tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings-juveniles were fed and compared with a reference and commercial diets respect their performance in a laboratory scale, according to the main parameters evaluated in aquaculture. With respect to the results obtained by the 3 techniques used, antioxidant properties of the diet are increased with the inclusion of the novel inputs. No differences were found between supplied feeds for biological parameters assessed in the tilapia, so no negative effect was considered during feeding with the novel functional diet. Therefore, the potential use of the evaluated by-products in commercial diets is inferred and an assessment of the functional feed during the next rearing stages of the species under commercial rearing conditions is suggested.

Keywords: mango; roselle; by-product; tilapia diet

RESUMEN

En la industria acuícola existe un creciente interés por la implementación de antioxidantes de origen natural

en dietas, debido a que los sintéticos están asociados a efectos cancerígenos y teratogénicos. Además, estos son incluidos para prevenir la oxidación de los lípidos en dichas dietas durante su almacenamiento y distribución, sin una perspectiva de sanidad de los organismos, que requieren micronutrientes como compuestos bioactivos, principalmente antioxidantes. Debido a lo anterior, se evaluó la inclusión de un subproducto de mango y jamaica (ricos en compuestos bioactivos) en una dieta acuícola sobre sus propiedades antioxidantes utilizando distintas técnicas: actividad antirradical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH●), reducción del ion férrico (FRAP, pos sus siglas en inglés) y concentración de compuestos fenólicos. Además, con esta dieta se alimentaron crías y juveniles de tilapia *Oreochromis niloticus* para evaluar su desempeño, comparada con una dieta base de referencia y una comercial, de acuerdo con los principales parámetros evaluados en la acuicultura. En los resultados obtenidos mediante las 3 técnicas utilizadas, las propiedades antioxidantes se incrementan con la inclusión de los insumos novedosos. En cuanto a los parámetros biológicos evaluados en la tilapia, no se encontraron diferencias entre los diferentes alimentos suministrados, por lo que se considera que no hubo un efecto negativo durante la alimentación con la dieta funcional novedosa. Por lo anterior, se infiere un uso potencial de los subproductos evaluados en dietas comerciales, sugiriendo la evaluación del alimento funcional en etapas de engorda de la especie y bajo condiciones de cultivo a escala comercial.

Palabras clave: mango; jamaica; subproducto; dieta tilapia

INTRODUCTION

Tilapia *Oreochromis niloticus* is valued in aquaculture because of its fast growth, disease tolerance, and other biotic and abiotic factors, which makes it a highly deman-

*Autor para correspondencia: Edgar Iván Jiménez Ruíz
 Correo electrónico: jiru80@gmail.com

Recibido: 30 de septiembre 2021

Aceptado: 17 de enero de 2022

ded species (Castillo-Juárez *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2012). Another advantage is that this species is omnivorous, whose feeding may include proteins, carbohydrates, vegetable oils, aquatic plants, animal by-products, fermented yeasts, and in some cases agroindustrial by-products in commercial feeds (González-Salas *et al.*, 2014).

The process of making aquaculture feed commonly includes butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) or tertiary butylhydroquinone (TBHQ), which are synthetic antioxidants used as additive in feed or products susceptible to lipid oxidation, however, they may show cytotoxic and carcinogenic effects (Laguerre *et al.*, 2007). Thus, the food industry shows a growing interest to substitute synthetic antioxidants with natural ones to be applied in food for human and animal consumption (Slimestad and Solhelm, 2004). Some alternatives as possible source of these bioactive compounds are using by-products as ingredients during aquaculture diet processing.

With respect to agroindustrial products, the state of Nayarit, Mexico produces more than 266,000 t of mango (*Mangifera indica*) annually, subjected to an agroindustrial process that generates large volumes of by-products (peel, kernel, and pulp adhered to both). These by-products contain an important concentration of bioactive compounds related with beneficial health effects, among which those that highlight are degenerative process prevention, such as cardiovascular diseases, antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities (Liu, 2003; Soonga and Barlow, 2004; Maisuthisakul and Gordon, 2009). Furthermore, they are used minimally in animal feed but may turn out to be a stable ingredient by using processing technologies, such as flour production, and avoid or reduce the contamination that this activity produces since these they are considered waste and commonly deposited in open-air dumping grounds (Lorenzo-Santiago *et al.*, 2018).

Likewise, the State of Nayarit, Mexico has the agroindustrial resource of roselle (*Hibiscus sabdariffa*), which produces more than 253 t annually. Currently, this industry has been in development process and during production, harvest, and calyx dry out by-products are generated (calyxes not suitable for commercialization). These by-products contain anthocyanins, polyphenols, and ascorbic acid, among other compounds with antioxidant, antibacterial, and diuretic properties (Reanmongkol and Itharat, 2007; Castillo-Juárez *et al.*, 2009), which may enhance the concentration of bioactive compounds -mainly antioxidants- in a balanced feed.

Additionally, rearing tilapia -same as other species- may show pathological events due to stress generated by management or so by adverse conditions in the environment, such as high ammonium concentration, low temperatures, and dissolved oxygen levels. At the same time, this situation may unleash mortalities that impact productivity and feasibility of the activity (Gallage *et al.*, 2016; Zeitoun *et al.*, 2016). In accordance with the above, natural antioxidants contained in aquaculture diets may impact beneficially on the organisms health to counteract events such as oxidative stress. There-

fore, the objective of this research was to assess antioxidant properties of a diet including mango and roselle by-products for tilapia (*Oreochromis niloticus*) during fingerling up to juvenile stages and their effects on biological production parameters.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of ingredients with antioxidant properties

By-products flour (peel, kernel, and pulp adhered to both) was obtained from mango "Ataulfo" (*Mangifera indica*) with fruits classified in the agroindustry as second class or waste because it does not comply with quality indexes for national or international marketing. Pulping was performed mechanically, and the by-product was dried at 45 °C for 12 h. Subsequently, it was passed through a hammer mill to then be sieved to a 250 µm particle size. On the other hand, an aqueous roselle (*Hibiscus sabdariffa*) extract was prepared with 1 g of ground roselle calyxes in 100 mL of distilled water (100 °C) for 3 min and then filtered through Whatman # 4 filter (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) (Prenesti *et al.*, 2005). This extract was used for dough hydration during feed production in one of the treatments described as follows.

Proximal composition of ingredients

For the experimental diets formulation, it was necessary to first perform proximate composition of the ingredients, according to the methods described by the Association of Official Analytical Chemists International (AOAC, 2012) to determine moisture (drying in an oven at 95-100 °C to constant weight), protein (crude protein: total nitrogen by micro-Kjeldahl method), lipids (crude lipid: petroleum ether extraction by Soxhlet method), and ash (incineration in a muffle furnace at 550 °C for 12 h).

Experimental feeds

Two feed diets were obtained, one as reference (RD) and the other one with mango by-product and roselle (MRD) extract inclusion; both diets contained 35 % protein and 8-12 % lipids, based on the proposal by Bureau and Cho (1994) and requirements issued by Mjoun *et al.* (2010) and FAO (2021).

The following ingredients were used: fish meal, soy, and wheat flour, fish oil, gluten, choline chloride, vitamins, and minerals; RD contained only the ingredients previously mentioned while MRD included 10 % mango by-product flour and 65 mL aqueous roselle extract for each 100 g of dry ingredient mixture (Table 1). The dry ingredients were mixed, subsequently, fish oil, water (RD) or roselle extract (MRD) were added, pelletized in a meat grinder with a 3 mm die, and finally dried at 45 °C for 12 h in a horizontal flux oven at air speed of 2 m/s. A commercial feed (CD) widely used in the region -reporting a minimum of 35 % and 8 % protein and lipids, respectively- was used in case of a third group. Diets were also analyzed for their proximal composition according to the techniques previously mentioned (AOAC, 2012).

Table 1. Formulation of experimental diets.

Tabla 1. Formulación de dietas experimentales.

Component (g/100g)	Diets	
	(RD)	(MRD)
Wheat flour	38.00	28.00
Soy flour	22.00	22.00
Fish meal	29.00	29.00
Fish oil ^d	4.30	4.30
Gluten	5.00	5.00
Vitamin Pre-mixture ^a	0.50	0.50
Vitamin C ^c	0.20	0.20
Mineral Pre-mixture ^b	0.50	0.50
Choline chloride ^f	0.50	0.50
Mango by-product flour	0.00	10.00
Total	100	100
Water	65 mL/100g	0.00
Roselle extract	0	65 mL/100g

RD: Reference diet.

MRD: Diet with mango and roselle by-product inclusion.

^a Vitamin pre-mix: vitamin A, 2400 IU o mg/g; vitamin D3, 2250 IU; vitamin E, 160 g; vitamin K3, 8 g; vitamin B1, 20 g; vitamin B2, 40 g; pantothenic acid, 60 g; nicotinic acid, 160 g; vitamin B6, 16 g; folic acid, 4 g; vitamin B12, 80 mg; biotin, 500 mg; vitamin C, 0.2 g; choline (as chloride) (Courtesy of Trouw Nutrition México S.A. de C.V.).

^b Mineral pre-mix: manganese, 100 g; zinc, 160 g; iron, 200 g; copper, 20 g; iodine, 5 g; selenium, 0.40 mg; cobalt 0.60 mg (Courtesy of Trouw Nutrition México S.A. de C.V.).

^c Courtesy of DSM Nutritional Products México S.A. de C.V.

^d Courtesy of Dr. Milton Spanopoulos Hernández, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Sinaloa.

^e Courtesy of Maz Industrial S.A de C.V., Mazatlán, Sinaloa.

^f Courtesy of M. Sc. Yessica Silva Carrillo.

Evaluation of antioxidant properties

Antiradical DPPH• activities. To measure this parameter, feed was subjected to ethanolic extraction by reflux for 3 h. The extracts were filtered through Whatman # 4 filter (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), and then stored at 4 °C until their analyses. The antiradical activity determination was performed using 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•) as a free radical test, following the methodology reported by Morales and Jiménez-Pérez (2001). The antioxidant activity was expressed as micromoles Trolox equivalent/gram of sample ($\mu\text{mol TE/g}$). Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic) is a reference molecule that shows a strong antiradical activity.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP). In this analysis, the ethanolic extracts previously described were used for the antiradical activity. The ferric reducing antioxidant power assay was performed following the technique described by Hinneburg *et al.* (2006). Quantification was made at an absorbance of 700 nm, and Fe (III) reduction was determined as micromoles Trolox equivalent/gram of sample ($\mu\text{mol TE/g}$).

Total phenolic compounds concentration. For this analysis, the ethanolic extracts obtained were used as previously described. The technique was performed according to that reported by Stintzing *et al.* (2005), in which Folin-Ciocalteu reagent was used. The concentration of these compounds was obtained from a standard curve of gallic acid (0-400 mg/L) and expressed as miligrams gallic acid equivalent/g of sample (mg EGA/g).

Experimental design and bioassay conditions

For this study, a completely randomized experimental design was applied with homogeneous organisms in weight, age, and same batch. Three treatments were established, corresponding to the three diets mentioned (RD, MRD and CD), each one with three replicates.

Specimens of tilapia *Oreochromis niloticus* variety *Chitralada* -acquired commercially with a supplier in Jamay, Jalisco, Mexico- were used in the experimental rearing system (Laboratory of Bioassays of the Food Technology Unit at the Universidad Autónoma de Nayarit, Mexico). Sixty-two organisms with a weight of 1.08 ± 0.04 g were sown in each one of the nine experimental 500 L tanks (three replicates per treatment). Feeding was performed manually three times a day (08:00, 12:00, 16:00 h) maintaining the conditions within the optimum intervals for the species, using heaters with thermostat and air pumps (temperature 29.56 ± 0.31 °C; dissolved oxygen 4.60 ± 0.02 mg/L; pH 7.06 ± 0.01). Morphometric analyses were performed every 15 days to adjust diet supply per feed percentage, starting with 15 % of average organism weight and decreasing according to fish development until 4 % after 10 weeks of bioassay length.

Growth performance and feed utilization indices

Biological assessment was developed through morphometric data and quantity of food ingested during the development of the experimental organisms according to the following methodologies: weight gain: WG (Utne, 1979); specific growth ratio: SGR (Ricker, 1979); feed conversion ratio: FCR (Kilambi and Robinson, 1979); protein efficiency ratio: PER (Hepher, 1988); survival ratio: SR (Halver and Hardy, 2002).

Statistical analyses

Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA), taking as main factor the three different feeds used during the experimental stage, and when significant differences were found, a multiple Tukey's test was performed considering a level of significance of 5 %. The analyses were performed with IBM SPSS Statistics 26 program (New York, U.S.A).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximal composition of ingredients and experimental diets

Table 2 shows the proximal composition of the ingredients used to produce the experimental diets. Gluten was

Table 2. Proximate composition of ingredients and experimental diets.
Tabla 2. Composición química de insumos y dietas experimentales.

Ingredient/ Diet	Moisture (%)	Protein (%)	Lipids (%)	Ash (%)
FM	5.52 ± 0.85	60.61 ± 4.02	13.86 ± 0.34	19.32 ± 0.58
FO	0.92 ± 0.48	-	97.57 ± 0.37	-
WF	11.62 ± 0.03	13.55 ± 0.41	1.93 ± 0.08	0.79 ± 0.01
SF	10.08 ± 0.11	52.71 ± 1.60	1.24 ± 0.02	7.62 ± 0.13
GL	7.11 ± 0.09	72.42 ± 2.84	1.10 ± 0.34	0.92 ± 0.03
MBF	15.22 ± 0.85	6.19 ± 0.98	2.15 ± 0.11	3.59 ± 0.40
CD	7.94 ± 0.07 ^b	35.34 ± 0.41 ^a	9.40 ± 0.24 ^b	9.75 ± 0.06 ^b
RD	7.40 ± 0.16 ^a	35.42 ± 0.71 ^a	8.06 ± 0.03 ^a	9.25 ± 0.05 ^a
MRD	7.55 ± 0.40 ^{ab}	35.57 ± 0.49 ^a	8.10 ± 0.03 ^a	9.70 ± 0.05 ^b

FM: fish meal; FO: fish oil; WF: wheat flour; SF: soy flour; GL: gluten; MBF: mango by-product flour; CD: Commercial diet; RD: Reference diet; MRD: Diet including mango and roselle by-products.
 Means in the same column with different superscript letters are statistically different ($P < 0.05$).

the ingredient with the greatest protein content: 72.42 ± 2.84 %, followed by fish meal: 60.61 ± 4.02 % and soy flour: 52.71 ± 1.60 %. Protein level for the ingredients commonly used in aquaculture feed have been previously reported. Tacon (1989) reported protein content of 45.8% in gluten, Álvarez *et al.* (2007) 62 % in fish meal and 44.2 % in soy flour, and recently, Jiménez-Ruiz *et al.* (2019) reported protein levels of 65, 55.92 and 43.05 % in gluten, fish meal, and soy flour, respectively. The differences found may be attributed to wheat and soy flour type, harvest season, and extraction temperature, whereas variation in protein percentage in fish meal may be due to manufacturing methods, organs or species used as raw matter, and season of the year. Corn and wheat gluten are some of the accepted inputs to be used in aquaculture diets where the maximum inclusion percentage recommended oscillates from 9 to 12.5 % conforming total feed (Koops *et al.*, 1982). This research included 9 % of wheat gluten and was used mainly as natural ligand (Devresse, 2000).

As to lipids, the greatest concentration was found in fish oil with 97.0 ± 0.06 %, followed by fish meal with 13.86 ± 0.34 % and mango by-product flour with 2.15 ± 0.11 %. Lipid content of this last one is attributed to the seed. Some studies have reported concentration from 12.8 % to 16.79 % in this part of the fruit (Pascual-Bustamante and Vilchis-Martínez, 2008; Rojas and Burbano, 2011).

Table 2 also shows the percentage composition of experimental diets that were initially projected and formulated with a protein content of 35 % and 8-12 % lipids, according to the nutritional requirements previously mentioned for the species (RD and MRD). The percentage content was isoproteic and isolipidic, since it did not show significant differences in the principal components (proteins and lipids) of these feeds ($P > 0.05$).

One of the aims of incorporating mango and roselle by-products in feed for tilapia is substituting synthetic antioxidants (mainly BHA and BHT) currently used to reduce deterioration, rancidity, and oxidative discoloration of lipids

in feed (Abdalla *et al.*, 2007). Additionally, it is important to consider the possible beneficial effects in organism health and their capacity to deal with events such as oxidative stress and pathologies that may occur. Nevertheless, more studies such as this one, where it is considered antioxidant properties of the proposed diets, growth performance and feed utilization indices are necessary.

Antiradical activity against DPPH●

Table 3 shows the results of antioxidant activity with the radical DPPH●, observing significant differences between diets ($P < 0.05$), where MRD showed 2.5 times greater antiradical activity than RD and three times more than CD. These results could be the effect of including mango and roselle by-products, which have an important antioxidant activity mainly related with anthocyanines and total phenolic compounds.

It should be mentioned that the antioxidant activity in CD may be due to the addition of synthetic antioxidants during its formulation, which are usually not declared in their labelling (Lundebye *et al.*, 2010). However, diets as MRD showing a high antioxidant activity without the incorporation of these synthetic compounds represent a great opportunity for utilizing agriculture products high in antioxidant compounds, which do not pose a health risk, differing from those synthetic of commercial use (Laguerre *et al.*, 2007). On the other hand, the antiradical activity in RD may be attributed to the bioactive compounds found in the basic ingredients such as wheat and soy flour and pre-mixture of vitamins (Devi *et al.*, 2009; Menga *et al.*, 2010; Shewry *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2012).

Diets for tilapia have been previously formulated with the inclusion of novel ingredients such as agroindustrial by-products with antioxidant properties, some have even assessed antiradical DPPH● capacity. Among the main studies are those by Jiménez-Ruiz *et al.* (2019) with avocado by-product, Ahmed *et al.* (2015) with edible mushroom, and Carbonera *et al.* (2014) with acerola extract by-product. In general, these studies attribute the antioxidant capacity against DPPH● radical to the bioactive compounds, among which those that stand out are phenolic type in each one of the ingredients used in food. As mentioned previously, in the case of this study, a greater MRD antiradical activity than in RD may be attributed to phenolic bioactive compounds found in mango and roselle by-products used (Soong and Barlow, 2004; Maisuthisakul and Gordon, 2009; Medina-Carrillo *et al.*, 2013).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Table 3 shows the results of the diets with respect to antioxidant capacity by the FRAP method. In this case, MRD again showed the highest values compared to the other diets ($P < 0.05$). Although CD showed an acceptable acting by the analysis of this technique, it was likely related to the inclusion of synthetic compounds in its formula (Lundebye *et al.*, 2010). On the other hand, when RD was compared to MRD, the difference in ion Fe (III) reduction capacity was at-

Table 3. Antioxidant properties of the experimental diets.
Table 3. Propiedades antioxidantes de dietas experimentales.

Diet	DPPH• (μmol TE/g)	FRAP (μmol TE/g)	TPC (mg GAE/g)
CD	4.23 ± 0.24 ^a	11.04 ± 0.14 ^b	1.54 ± 0.10 ^b
RD	5.23 ± 0.48 ^b	9.91 ± 0.02 ^a	0.96 ± 0.24 ^a
MRD	13.25 ± 0.19 ^c	11.99 ± 0.05 ^c	2.51 ± 0.07 ^c

CD: Commercial diet; RD: Reference diet; MRD: Diet including mango and roselle by-products.

DPPH•: Antiradical activity DPPH•.

FRAP: Capacity for iron Fe III ion reduction.

CFT: Concentration of total phenolic compounds.

Means in the same column with different superscript letters are statistically different ($P < 0.05$).

tributed to the inclusion of the non-conventional ingredients assessed. This result can be explained because they were the only difference with respect to the elements incorporated during diets formulation.

The DPPH• method has been reported to be directly related with the evaluation of antioxidant capacity, mainly due to hydrophobic compounds, while FRAP relates to the hydrophilic type. Thus, the fact the MRD showed similar values for both techniques may be indicating that the non-conventional ingredients are contributing to a mechanism of action related to both types of systems. The mango and roselle by-products have been previously reported to show the capacity for ion Fe (III) reduction (Medina-Carrillo *et al.*, 2013; Sumaya-Martínez *et al.*, 2019).

Currently, not many reports exist of tilapia diet that have been analyzed by this method. Some works related with feed for the same species are those Jiménez-Ruiz *et al.* (2019), using avocado by-product, Carbonera *et al.* (2014) with acerola waste, and Rahman *et al.* (2017) in feed for shrimp using *Tetraselmis chuii* microalgae biomass. These works agree in that antioxidant properties of the experimental diets by this technique are attributed to bioactive compounds added when the assessed non-conventional ingredients were incorporated.

Total phenolic compounds concentration

The diets evaluated showed significant ($P < 0.05$) differences in regard to these bioactive compounds, where greater concentration was found in MRD with 2.50 μmol GAE/g with respect to RD and CD, which showed 0.95 and 1.53 μmol GAE/g, respectively (Table 3). The increase in more than double the value of MRD with respect to RD is attributed to the contribution of the phenolic compounds from mango by-product and roselle extract. These results agree with previous works where both non-conventional ingredients included in this study have demonstrated to be rich in such compounds (Medina-Carrillo *et al.*, 2013; Sumaya-Martínez *et al.*, 2019). In the case of mango, the main phenolic compounds found are mangiferin, catechin, epicatechin, chercetin, isochercetin and anthocyanins (Masibo and He, 2008). With respect to roselle, proanthocyanins, catechins, anthocyanins, chlorogenic acid and galic acid have been mainly mentioned (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011; Reyes-Luengas *et al.*, 2015). Ajila *et*

al. (2012) mentioned to the phenolic compounds as main components to consider when studying the potential use of agroindustrial waste in animal feed.

On the other hand, the total phenolic compound concentration in CD and RD may also be explained by the diet formulation since for example in RD ingredients such as wheat and soy flour, and gluten were used, which have demonstrated to contain such compounds (Pimiä *et al.*, 2001; Milner, 2004; Menga *et al.*, 2010; Shewry *et al.*, 2010). In the case of commercial feed, the concentration found may be attributed to the addition of antioxidants such as BHA, BHT, and TBHQ that are synthetic phenolic compounds (Lundebye *et al.*, 2010). With respect to this, although CD showed considerable values in the test, MRD continued having an advantage in providing such compounds in feed from a natural source.

Few works have been found related directly with this study, where total phenolic compounds have been determined in diets for tilapia, including non-conventional ingredients from agroindustrial by-products. Previously, Galeana-López *et al.* (2020) worked with a corn husk extract (CHE), and their results suggest that its inclusion improve antioxidants properties in the feed and promote growth performance; Jiménez-Ruiz *et al.* (2019) with avocado by-product, who propose the use of this paste due to its antioxidant properties and the value added that would be granted; Ahmed *et al.* (2015) utilizing an edible mushroom reported a beneficial effects in organisms respect to oxidative stress, Obasa *et al.* (2013) with fermented mango seed replacing at 50% of yellow maize without affect growth and nutrient utilization indices, and Lim and Lee (2011) with fermented soy flour and cotton seed incorporated in feed reported a enhancement in antioxidant activity of both diet and fish. Most of these works have reported a greater total phenolic compounds concentration than MRD, which could be attributed to the different raw matter used. However, in this study, to obtain the ingredients such as mango by-product and roselle extract, required minimal processes to incorporate them to the diet, without the need for laborious extractions or fermentations to improve their functional properties.

Growth performance and feed utilization indices

The results for the zootechnical parameters in weight gain (WG), specific growth ratio (SGR), feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER) and survival ratio (SR) are shown in Table 4. No significant differences ($P > 0.05$) between diets are observed, which may be considered as indicator that including non-conventional ingredients in MRD did not hinder development of the organisms at this growth stage. The added value given to mango and roselle by-products represents an advantage that should be considered. Furthermore, the potential benefits of the antioxidant properties that may be granted to the diets with bioactive compounds from a natural source for organisms health.

Some related studies have experimented implementing similar by-products in tilapia nilótica. Souza *et al.* (2013) worked with mango waste flour (pulp and peel) reporting

Table 4. Growth performance and feed utilization indices of tilapia *Oreochromis niloticus* fed with three experimental diets.

Tabla 4. Desempeño del crecimiento e índices de utilización del alimento de tilapia *Oreochromis niloticus* alimentada con tres dietas experimentales.

	CD	RD	MRD
Weight gain (WG, g)	42.85 ± 4.46 ^a	48.72 ± 2.57 ^a	44.99 ± 2.21 ^a
Specific growth ratio (SGR, % day ⁻¹)	3.61 ± 0.13 ^a	3.74 ± 0.15 ^a	3.66 ± 0.08 ^a
Feed conversion ratio (FCR)	1.4 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.01 ^a	1.5 ± 0.02 ^a
Protein efficiency ratio (PER)	1.07 ± 0.11 ^a	1.22 ± 0.06 ^a	1.12 ± 0.06 ^a
Survival ratio (%)	89.4 ± 2.04 ^a	95.8 ± 2.42 ^a	90.3 ± 3.33 ^a

CD: Commercial diet; RD: Reference diet; MRD: Diet including mango and roselle by-products.

Means in the same row with different superscript letters are statistically different ($P < 0.05$).

the possibility of including up to 10 % in diet formulation without adversely affecting development of the organisms with respect to feeding and growth. Different from their work, this study took advantage of all the fruit by-product (peel, kernel, and pulp adhered to both). Omojowo *et al.* (2012) worked with mango peel flour with different levels of inclusion in the experimental diets (0, 12, 24, 36 and 48 %), concluding that the zootechnical parameters evaluated were more affected as such ingredient increased. In fact, although the level of inclusion of 12 % promoted better performance in the organisms, it was not better when compared to the control diet (0 %).

Omoriegie (2001) evidenced better growth performance in the organisms when 10 % of mango kernel flour was included than in diets containing 20 and 30 %. Nevertheless, different from this study, the results were better when they used a commercial diet as reference. With respect to roselle, Amani *et al.* (2016) evaluated diets with inclusion of 0.5, 1, and 1.5 % of roselle calyxes and found that 1 % of this ingredient promoted better growth performance of the organisms. In this study, the final inclusion of roselle calyx powder was 0.6 %, which did not affect the zootechnical parameters evaluated.

Finally, one of the challenges when non-conventional ingredients are included in animal feed may be taste and acceptance by the organisms fed. In this case, no problems were observed in feed consumption at the start of the experiment, because the organisms were in their fingerling stage, so they did not show difficulties to adapt to the experimental diet. However, when working with organisms of greater sizes that have already previously fed with a commercial feed for some time, a period of adaptation to the new diet is necessary. Previously, Omoriegie (2001) reported one week as a period of adaptation to a diet for *Labeo senegalensis* that included mango and palm kernel seeds.

CONCLUSIONS

The inclusion of mango and roselle by-products promoted an increase in antioxidant properties of the diet for tilapia. Additionally, according to the biological parameters evaluated, the organisms were not affected by the inclusion of these non-conventional ingredients. Thus, the potential use of this diet for fingerling and juvenile stages is considered feasible in the near future. However, this diet should be evaluated in the next rearing stages of the organisms as well as assessment under farming conditions where the organisms are exposed to real rearing conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This article is the thesis product to obtain the degree of Master of Science of the student Jesús Ernesto Rincones López, developed in the Laboratory of Bioassays and Laboratory of Special Analyses of the Food Technology Unit at Universidad Autónoma de Nayarit (UAN), México. Members of the Cuerpo Académico de Biotecnología de Alimentos Funcionales (UAN-CA-255) and Red Temática de Bioproductos y Bioprocesos participated in this study. All authors are thankful to Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACyT for financing to performe this project with reference 288594; to D. Fischer for providing translation and edition.

REFERENCES

- Abdalla, M., Darwish, M., Ayad, E. El-Hamahmy, M. 2007. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103, 1141-1152.
- Ahmed, M., Abdullah, N., Yusof, H.N., Shuib, A.S. Razak, S.A. 2015. Improvement of growth and antioxidant status in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed diets supplemented with mushroom stalk waste hot water extract. *Aquaculture Research*, 1-12.
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, D.R., Godbout, S. Valéro, J.R. 2012. Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4), 382-400.
- Álvarez, J. 2007. Sustitución de harina de pescado por harina de soya e inclusión de aditivos en el alimento a fin de mejorar la engorda del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. (Tesis de Doctorado). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. S. C., La Paz, Baja California Sur, México.
- Amani, M.D.M., Ahmad, M.H., Souleman, A.M.A., El-Morsy, A.T. El-Naby, A.S.A. 2016. Effects of roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa*) supplemented diets on growth and disease (*Aeromonas hydrophila*) resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 15, 78-87.
- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- Bureau, D. Cho, C. 1994. Introduction to nutrition and feeding of fish. University of Guelph, Ontario, Canada, Internal Report.
- Pascual-Bustamante, S. Vilchis-Martínez, G. 2008. Caracterización del aceite obtenido de almendras de diferentes variedades de mango y su aplicación como sustituto de manteca de cacao en rellenos y coberturas de chocolate (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México,

- Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Carbonera, F., Montanher, P.F., Palombini, S.V., Maruyama, S.A., Claus, T., Santos, H.M.C., Sargi, S.C., Matsushita, M. Visentainer, J.V. 2014. Antioxidant capacity in tilapia filets enriched with extract of acerola fruit residue. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(7), 1237-1245.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. Romero, I. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 402-405.
- Devi, A.M., Gondi, M., Sakthivelu, G., Giridhar, P., Rajasekaran, T. Ravishankar, G. 2009. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114, 771-776.
- Devresse, B. 2000. Producción de alimentos para camarón estables en el agua. In: *Avances en Nutrición Acuícola IV*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 2021. <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/nile-tilapia/nutritional-requirements/en/>.
- Galeana-López, J.A., Hernández, C., Leyva-López, N., Lizárraga-Velázquez, C.E., Sánchez-Gutiérrez, E.Y. Heredia, J.B. 2020. Corn husk extracts as an antioxidant additive in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings: effect on growth performance, feed intake and toxicity. *Biotecnia*, 22(2), 147-154.
- Gallage, S., Katagiri, T., Endo, M., Futami, K., Endo, M. Maita, M. 2016. Influence of moderate hypoxia on vaccine efficacy against *Vibrio anguillarum* in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Fish and Shellfish Immunology*, 51, 271-281.
- González-Salas, R., Romero-Cruz, O., Valdiviá-Navarro, M. Ponce-Palafox, J.T. 2014. Los productos y subproductos vegetales, animales y agroindustriales: Una alternativa para la alimentación de la tilapia. *Revista Biociencias*, 2, 240-251.
- Halver, J.E. Hardy, R.W. 2002. *Fish nutrition*. New York. Academic Press, 824 pp.
- Hepher, B. 1998. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge. Cambridge University Press, 388 pp.
- Hinneburg, I., Dorman, H. Hiltunen, R. 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 97, 122-129.
- Jiménez-Ruiz, E.I., Rodríguez-Carpena, J.G., Hernández-Ortega, G.P., Sumaya-Martínez, M.T., Balois-Morales, R., Sánchez-Herrera, L.M. Peraza-Gómez, V. 2019. Antioxidant properties of a tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet with the inclusion of avocado by-product. *Biotecnia*, 21, 163-169.
- Kilambi, R.V. Robison, W.R. 1979. Effects of temperature and stocking density on food consumption and growth of grass carp *Ctenopharyngodon idella*, Val. *Journal of Fish Biology*, 15, 337-342.
- Koops, H., Tiewes, K., Gropp, J. Schwalb, B. 1982. Further results on the replacement of fish meal by other protein feed-stuffs in pellet feeds for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Archiv für Fischereiwissenschaft*, 32, 59-75.
- Laguerre, M., Lecomte, J. Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-82.
- Lim S.J. Lee K.J. 2011. A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 494-503.
- Liu, R. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517-520.
- Lorenzo-Santiago, M.A., Juárez-López, A.L., Rosas-Acevedo, J.L., Rendón-Villalobos, J.R., Toribio-Jiménez, J. García-Hernández, E. 2018. Management and final disposal of mango waste in the State of Guerrero, Mexico: a brief review. *The Journal of Agricultural Science*, 10(12), 34-41.
- Lundebye, K., Hove, H., Mage, A., Bohne, V. Hamre, K. 2010. Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish. *Food Additives and Contaminants*, 27, 1652-165.
- Lv, J., Yu, L., Lu, Y., Niu, Y., Liu, L., Costa, J. Liangli, Y.L. 2012. Phytochemical compositions, and antioxidant properties, and antiproliferative activities of wheat flour. *Food Chemistry*, 135, 325-331.
- Maisuthisakul, P. Gordon, M. 2009. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 117, 332-341.
- Masibo, M. He, Q. 2008. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 309-319.
- Medina-Carrillo, R.E., Sumaya-Martínez, M.T., Machuca-Sánchez, M.L., Sánchez-Herrera, L.M., Balois-Morales, R. Jiménez-Ruiz, E.I. 2013. Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 Variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en función de fenólicos y antocianinas totales. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 22, 41-44.
- Menga, V., Fares, C., Troccoli, A., Cattivelli, L. Baiano, A. 2010. Effects of genotype, location and baking on the phenolic content and some antioxidant properties of cereal species. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 7-16
- Milner, J.A. 2004. Molecular targets for bioactive food components. *Journal of Nutrition*, 134, 2492-2498.
- Mjoun, K., Rosentrater, K. Brown, M.L. 2010. Tilapia: Environmental Biology and Nutritional Requirements. SDSU Extension Fact Sheets Fact Sheets, 164, 1-7.
- Morales, F. Jiménez-Pérez, S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72, 119-125.
- Obasa, S.O., Alatise, S.P., Omoniye, I.T., Alegbeleye, W.O. George, F.A. 2013. Evaluation of fermented mango (*Mangifera indica*) seed meal in the practical diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Croatian Journal of Fisheries*, 71, 116-123
- Omojowo, T.M., Omojowo, F.S. Alatise, P.S. 2012. Growth response and nutritional evaluation of mango peel-based diets on tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Researcher*, 2(6), 44-49.
- Omeregíe, E. 2001. Utilization and nutrient digestibility of mango seeds and palm kernel meal by juvenile *Labeo senegalensis* (Antheriniformes: Ciprinidae). *Aquaculture Research*, 32(9), 681-687.
- Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A. Oksman, C.K. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494-507.

- Prenesti, E., Berto, S., Pier, G. Toso, S. 2005. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry*, 100, 433-438.
- Rahman, N.A., Khatoon, H., Yusuf, N., Banerjee, S., Haris, N.A., Lananan, F. Tomoyo, K. 2017. *Tetraselmis chuii* biomass as a potential feed additive to improve survival and oxidative stress status of Pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *International Aquatic Research*, 9, 235-247.
- Ramírez-Rodríguez, M.M., Plaza, M.L., Azeredo, A., Balaban, M.O. Marshall, M.R. 2011. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science*, 76(3), 428-435.
- Reanmongkol, W. Itharat, A. 2007. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces in experimental animals. *Songklanakarín Journal Science Technology*, 29, 29-38.
- Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M.E., Arteaga-Garibay, R.I. Martínez-Peña, M.D. 2015. Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) con cálices de colores diversos. *Agrociencia*, 49(3), 277-290.
- Ricker, W. 1979. Growth rates and models. In: *Fish Physiology*. Volume VIII; Bioenergetics and Growth. New York, USA. Academic Press, 677-743 pp.
- Rojas, F. Burbano, F. 2011. Efecto de un pretratamiento enzimático en el proceso de obtención de aceites de la semilla de mango (*Mangifera indica*). (Tesis de Licenciatura). Universidad del Valle. Santiago de Cali, Colombia. 2011.
- Shewry, R., Jenkins, J., Beaudoin, F. Clare, N. 2010. The classification, functions and evolutionary relationships of plant proteins in relation to food allergies. In: *Plant food allergens*. Oxford, UK: Blackwell Science, 24-41.
- Slimestad, R. Solheim, H. 2004. Anthocyanins from blackcurrants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3228-3231.
- Soong, Y.Y. Barlow, J.P. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 88, 411-417.
- Souza, R.C., Melo, J.F.B., Nogueira-Filho, R.M., Campeche, D.F.B. Figueiredo, R.A.C.R. 2013. Influência da farinha de manga no crescimento e composição corporal da tilápia do Nilo. *Archivos de Zootecnia*, 62, 217-225.
- Stintzing, F., Herbach, K., Mosshammer, R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C., Bunch, R. Felker, P. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442-451.
- Sumaya-Martínez, M., Medina-Carrillo, R.E., González-Ocegueda, E., Jiménez-Ruiz, E.I., Balois-Morales, R., Sánchez-Herrera, M.L. López-Nahuatt, G. 2019. Mango (*Mangifera indica*) pulping byproducts: antioxidant activity and bioactive compounds of three mango cultivars antioxidant activity by-products of mango. *Revista Bio Ciencias*, 6, 560.
- Tacon, J. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. Documento de campo No.4. FAO 1989; Brasilia, Brasil. 592.
- Torres, D., Hurtado, N. Víctor, L. 2012. Requerimientos nutricionales para la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Orinoquia*, 16, 63-68.
- Utne, F. 1979. Standard methods and terminology in finfish nutrition. *Proc. Symp. Finfish Nutrition and Fish feed Technology*, Hamburg, 437-443.
- Zeitoun, M.M., EL-Azrak, K.E.M., Zaki, M.A., Nemat-Allah, B.R. Mehana, E. 2016. Effects of ammonia toxicity on growth performance, cortisol, glucose and hematological response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aceh Journal of Animal Science*, 1, 21-28.

Rentabilidad y rendimiento de tres genotipos de maíz en respuesta al biofertilizante y nitrógeno, en clima templado

Profitability and yield of three corn genotypes in response to biofertilizer and nitrogen, in mild weather

Aguilar-Carpio C¹, Escalante-Estrada JAS^{1*}, Aguilar-Mariscal I², Rojas-Victoria NJ¹

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

² Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de biología. Av. Universidad 1001, CP 62210. Cuernavaca, Morelos.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la producción de materia seca total, rendimiento de grano, sus componentes y rentabilidad en tres genotipos de maíz en respuesta al nitrógeno y biofertilizante, en clima templado. El estudio se estableció en Montecillo, Estado de México. Los tratamientos consistieron en la siembra del maíz criollo Michoacán 21, una variedad sintética HS-2 y el híbrido Promesa, los cuales fueron inoculados con biofertilizantes, en diferentes niveles de nitrógeno 0, 80 y 160 kg ha⁻¹. A madurez fisiológica se evaluó la materia seca total (MS), rendimiento de grano (RG) y sus componentes. Adicionalmente, se realizó un análisis económico. La aplicación de biofertilizante y nitrógeno ocasionó incrementos en la producción de MS, RG y sus componentes en función del genotipo utilizado. Michoacán-21 presentó un efecto positivo con el uso de biofertilizante en la MS y RG. En general, la mayor MS se logró con la aplicación de 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno en el genotipo HS-2 y en el caso del RG el más alto fue con Promesa y nitrógeno a 160 kg ha⁻¹, el cual presentó el mayor ingreso neto y total.

Palabras claves: producción; fertilización; grano.

ABSTRACT

The objective of the study was to determine dry matter production, grain yield, its components and profitability in three corn genotypes, in response to nitrogen and biofertilizer, in a mild climate. The study was established in Montecillo, State of Mexico. The treatments consisted of the Michoacán-21 native corn, synthetic variety HS-2 and Promesa hybrid planting, inoculated with biofertilizers, at different nitrogen levels (0, 80 and 160 kg ha⁻¹). At physiological maturity, the total dry matter (DM), grain yield (GY) and its components were evaluated. Additionally, an economic analysis was carried out. The application of biofertilizer and nitrogen caused increases in the production of DM and GY and their components, depending on the genotype used. Michoacán-21 presented a positive DM and GY effect with the use of biofertilizer. In general, the highest DM was achieved with the application of 160 kg ha⁻¹ of nitrogen in the HS-2 genotype and in the case of GY the highest was with Promesa and 160 kg ha⁻¹ of nitrogen, which presented the highest net and total income.

Key words: Production; fertilization; grain.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.), es de los primordiales alimentos para los mexicanos, a nivel nacional se siembran 5,908,496.60 ha, bajo condiciones de lluvia estacional y se producen 13,858,420.47 t. Dentro de los principales productores se encuentra el Estado de México, el cual siembra alrededor de 415,580 ha, en donde se producen 1,398,333.46 t con un rendimiento promedio de 3.49 t ha⁻¹ (SIAP, 2020). Los agricultores de lluvia estacional optan por cultivar variedades criollas; sin embargo, estas razas presentan características agronómicas que afectan significativamente el rendimiento del grano, como son: acame, un alto porcentaje de plantas improductivas y la pudrición de grano (Gómez et al., 2014). El uso de variedades mejoradas es una alternativa, que puede ayudar a incrementar la producción de maíz (Aguilar-Carpio et al., 2017). Por lo que, es importante evaluar diferentes variedades y así poder obtener información sobre el manejo agronómico, áreas de adaptación óptimas, fertilización convencional, respuesta a biofertilizantes, además de otra información que permita elevar el rendimiento. Dentro del manejo, la fertilización nitrogenada es determinante para incrementar el rendimiento de maíz (Aguilar et al., 2016). El nitrógeno es el nutrimento más importante para la producción, tanto el agua como el nitrógeno deben estar bien provistos en cantidad y oportunidad para asegurar un estado fisiológico óptimo al momento de la floración, que es cuando se determina el rendimiento (Khaliq et al., 2009). Sin embargo, la fertilización nitrogenada representa una inversión de alto costo y muchas veces utilizado ineficientemente, que causa riesgo ambiental. Una alternativa a este problema es el uso del biofertilizante. Su importancia en la agricultura es debido a la asociación de los microorganismos con las raíces de las plantas (Díaz et al., 2013). Sin embargo, la respuesta del cultivo al biofertilizante puede ser variable debido a la precipitación pluvial, temperatura, características físicas y químicas del suelo de cada región y el genotipo utilizado (Armenta et al., 2010). Estudios en maíz, indican que con la inoculación de *Azospirillum brasilense* o *Glomus intraradice* en la semilla, incrementa significativamente la producción del grano, e inclusive igualaron o superaron al testigo con fertilización química (Díaz-Franco et al., 2008). García-Olivares et al. (2007) al evaluar en campo, la cepa de *A. brasilense* (CBG-497) reportan un incremento de 0.3 t ha⁻¹ en el rendimiento

*Autor para correspondencia: José Alberto Salvador Escalante Estrada
 Correo electrónico: jasee@colpos.mx

Recibido: 21 de octubre 2021

Aceptado: 28 de febrero de 2022

del maíz 'Asgrow-Tigre', mientras que en 'Dekalb-2003' y 'Garst-8222' el rendimiento se incrementó en 1.3 y 0.3 t ha⁻¹ (8%), respectivamente. En general, los antecedentes indican que la inoculación basada en *Azospirillum brasilense* y la asociación con *Glomus* incrementan el rendimiento tanto en maíz criollo como híbrido. Con base a lo antes, es importante generar información sobre el tema en clima templado, ya que es indispensable seguir incrementando el rendimiento de forma más rentable, por lo que, el objetivo del presente estudio fue determinar la producción de materia seca, rendimiento, sus componentes y rentabilidad en tres genotipos de maíz en siembra de temporal, en respuesta al biofertilizante y nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se estableció bajo condiciones de temporal en Montecillo, Estado de México, de clima templado con régimen de lluvias en verano con precipitación anual de 558 mm y altitud de 2240 m (BS, García, 2005). El 04 de mayo de 2012 se sembraron los genotipos Michoacán 21, HS-2 y Promesa, los tratamientos consistieron en la inoculación a la semilla del biofertilizante que contiene bacterias fijadoras de nitrógeno *Azospirillum brasilense* y hongos micorrízico (*Rhizophagus intraradices*), en diferentes niveles de nitrógeno 0, 80 y 160 kg ha⁻¹, el cual se aplicó de forma fraccionada, la mitad de nitrógeno a los 10 días después de la siembra (dds) y el resto a los 40 dds. La densidad de población fue de 6.25 plantas m⁻². El diseño experimental fue bloques completamente al azar con arreglo de parcelas subdivididas y cuatro repeticiones. La unidad experimental fue de cuatro surcos de 0.8 m de ancho x 4 m de longitud. Para conocer las características iniciales del suelo en los primeros 30 cm de profundidad, se realizó un análisis físico y químico en el Laboratorio de Nutrición Vegetal S. C., Fertilab. Los resultados indican que es un suelo de textura franco arcillo arenoso, densidad aparente de 1.22 g cm⁻³, pH 8.2, conductividad eléctrica 0.41 dS m⁻¹, materia orgánica de 1.70 % y nitrógeno inorgánico 3.46 ppm. Durante el desarrollo del estudio se registró la temperatura máxima (T_{máx}) y mínima (T_{mín}) decenal y la suma de la evaporación (Ev, mm) y precipitación (PP, mm), datos proporcionados por la estación Agrometeorológica del Colegio de postgraduados. También se registró la ocurrencia de las fases fenológicas como: días a emergencia (E), floración (FL) y madurez fisiológica (MF). El criterio utilizado para estas variables fue presentado por Ritchie y Hanway (1982). También, para cada fase fenológica se determinó la acumulación de unidades calor para el cultivo (UC, °C días), mediante el método residual, el cual es descrito por la siguiente ecuación como se indica por Snyder (1985):

$$UC = (T_{máx} + T_{mín} / 2) - TB$$

Donde: T_{máx} y T_{mín} son diarias (°C) y TB = Temperatura base, considerada como 7 °C (Villalpando y Ruíz, 1993). La evapotranspiración del cultivo (ET_c) se calculó a partir de los datos de la evaporación (Ev) del tanque tipo "A", utilizando 0.6

como coeficiente para el evaporímetro, kc inicial = 0.35, kc a mediados del periodo = 1.14 y kc final = 0.6 (Doorenbos y Pruitt, 1986), a partir de la siguiente ecuación:

$$ET_c = E_v \times 0.6 \times K_c$$

A MF se evaluó la materia seca total (MS, g m⁻²), índice de cosecha (IC, %), rendimiento de grano (RG, 10% de humedad, g m⁻²), peso de 100 granos (P100G, g), número de granos (NG, m²), número de hileras (NH) y número de granos por hilera (NGH). A las variables en estudio, se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA), con el programa estadístico de SAS, Versión 9.0 (SAS, 2003), la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Adicionalmente, se realizó un análisis económico para determinar la rentabilidad de cada tratamiento, tomando en cuenta el costo total (CT) y el ingreso total (IT), que sirvieron de base para determinar el ingreso neto (IN) y la ganancia por peso invertido (GPI); se utilizaron las siguientes ecuaciones (Aguilar *et al.*, 2016):

Costo Total (CT). Es la suma de los costos fijos (CF) y variables (CV).

$$CT = (CF + CV)$$

Ingresos totales (IT) se deriva de la venta total del producto y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$IT = P_y Y$$

Dónde: P_y = Precio del producto, Y = Producción ha⁻¹. Ingreso neto (IN) es el monto en efectivo (ganancias) obtenido; se determina de la diferencia entre el Costo total (CT) y el ingreso total (IT).

$$IN = (IT - CT)$$

Ganancia por peso invertido (GPI) permite determinar la rentabilidad de los tratamientos evaluados. Se obtuvo dividiendo el Ingreso neto (IN) entre el Costo total (CT).

$$GPI = (IN / CT)$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Fenología, condiciones climáticas, unidades calor y evapotranspiración

En la Figura 1, se observa la media decenal de la T_{máx} y T_{mín} durante el desarrollo de los genotipos de maíz. Durante la etapa de S a FL, la T_{máx} y T_{mín} promedio fluctuó desde los 3 °C hasta los 34 °C, en la etapa de FL a MF fue de 5 a 28 °C, respectivamente. Es importante indicar, que estos umbrales térmicos varían en función del genotipo. Pecina-Martínez *et al.* (2009) mencionan que los genotipos de maíz adaptados a los valles altos de México se desarrollan en umbrales térmicos en promedio de 18 a 22 °C. Aguilar *et al.* (2016) reportaron temperaturas de 8 a 31 °C, para Montecillo, Estado de México, tendencias similares al presente estudio.

La suma decenal de la PP fue de 344 mm durante el ciclo de cultivo. En el estudio, se aplicó un riego después de la

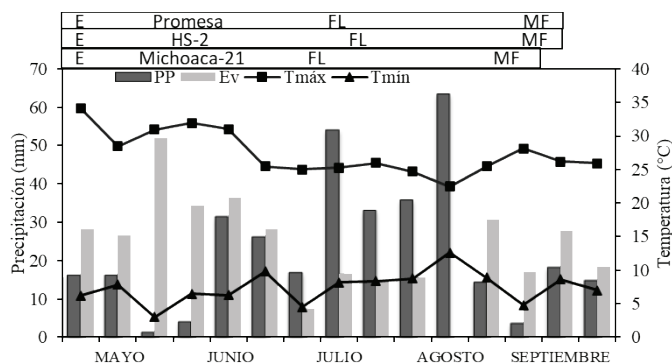


Figura 1. Medias decenales de la temperatura máxima (Tmáx, °C) y mínima (Tmín, °C), suma decenal de la precipitación (PP, mm) y evaporación (Ev) durante el ciclo del cultivo de los maíces Michoacan-21, HS-2 y Promesa. E=Emergencia, FL=Floración, MF=Madurez fisiológica.

Figure 1. Decennial averages of the maximum (Tmax, °C) and minimum (Tmin, °C) temperature, decennial sum of precipitation (PP, mm) and evaporation (Ev) during the Michoacan-21, HS-2 and Promesa maize crop cycle. E=Emergence, FL=Flowering, MF=Physiological maturity.

siembre para lograr una emergencia homogénea del cultivo. La mayor PP (273 mm) se presentó en los meses de julio y agosto, en la etapa de FL a MF, sin embargo, de S a FL la PP fue de 71 mm, esto indica que el cultivo pudo afectarse y no completar sus necesidades hídricas. Esto señala, que la baja disponibilidad de agua puede repercutir en el rendimiento. Al respecto, Aguilar *et al.* (2016) registraron una precipitación de 504 mm durante el desarrollo del cultivo de maíz, en Montecillo, Estado de Mexico.

La ocurrencia de las etapas fenológicas fue diferente para los genotipos en estudio, no así para la emergencia que sucedió a los 8 dds. La floración de Michoacan-21 ocurrió a los 80 dds, en HS-2 a los 90 dds y en Promesa a los 87 dds. La MF en Michoacan-21 a los 130 dds, en HS-2 y Promesa a los 140 dds (Figura 1).

En la Figura 2 se observa la acumulación de UC durante el ciclo de cultivo, el cual fue diferente entre genotipos; para Michoacan-21, HS-2 y Promesa de siembra a emergencia las UC fueron de 120 °C días; de S a FL fue de 785, 899 y 830 °C días y de FL a MF de 595, 532 y 601 °C días, respectivamente. El total de las UC fue de 1450 °C días para Michoacan-21 y 1551 °C días, para HS-2 y Promesa, esto debido a las diferencias en la duración del ciclo de cada genotipo utilizado (Figura 2). Para la ETc, se observó que en el periodo de siembra a emergencia en los tres genotipos fue de 12 mm, de E a FL fue de 165, 190 y 177 mm, de FL a MF fue de 184, 178 y 191 mm para Michoacan-21, HS-2 y Promesa, respectivamente. La ETc total fue de 361 mm para Michoacan-21, en HS-2 y Promesa, fue de 380 mm (Figura 2). Lo anterior señala, que las necesidades hídricas fueron mayores en los genotipos HS-2 y Promesa, debido a su ciclo de crecimiento.

Materia seca total (MS), índice de cosecha (IC), rendimiento (RG) y sus componentes

El ANDEVA para MS, IC y RG mostró cambios significativos debido a genotipos (G), nitrógeno (N) y las interacciones, genotipo x biofertilizante (G x Bio), genotipo x nitrógeno

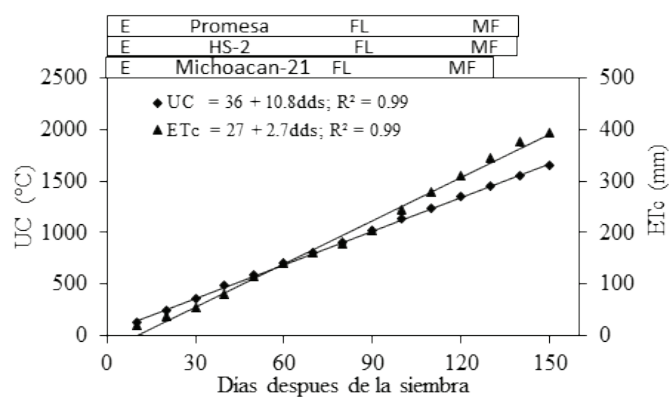


Figura 2. Unidades calor (UC), evapotranspiración del cultivo (ETc) y fenología durante el ciclo del cultivo en los maíces Michoacan-21, HS-2 y Promesa. E = Emergencia, FL = Floración, MF = Madurez fisiológica.

Figure 2. Heat units (HU), crop evapotranspiration (ETc) and phenology during Michoacan-21, HS-2 and Promesa corn crop cycle. E = Emergence, FL = Flowering, MF = Physiological maturity.

(G x N) y genotipo x biofertilizante x Nitrógeno (G x Bio x N). Se observaron diferentes respuestas en los componentes del RG en las interacciones, así como en factores principales. Cabe señalar, que la presentación de los resultados en las interacciones se hizo con base a MS y RG (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de varianza para materia seca total (MS), índice de cosecha (IC), rendimiento de grano (RG) y sus componentes.

Table 1. Analysis of variance for total dry matter (DM), harvest index (HI), grain yield (GY) and its components.

Factor	MS	IC	RG	P100G	NH	NGH	NG
	g m ⁻²	%	g m ⁻²	g			m ²
G	**	**	**	**	NS	*	*
Bio	**	**	NS	NS	NS	NS	NS
G x Bio	**	*	*	NS	NS	*	NS
N	**	**	**	**	*	NS	*
G x N	*	*	*	*	*	NS	NS
Bio x N	NS	*	**	*	*	NS	NS
G x Bio x N	*	*	*	**	*	*	**

*, ** = P ≤ 0.05, 0.01, respectivamente; NS = No significativo a P ≥ 0.05; P100G = Peso de 100 granos, NH = Número de hileras, NGH = Número de granos por hilera. NG = Número de granos. G = Genotipo, Bio = Biofertilizante, N = Nitrógeno.

Genotipo

En la Tabla 2, se observa que en la producción de MS y RG en los cultivares mejorados fue superior al maíz criollo. El genotipo HS-2 presentó un incremento del 55% en MS con respecto a Michoacan-21, debido al ciclo del cultivo el genotipo HS-2 tuvo mayor oportunidad de interceptar luz y agua. El RG mas alto se registró también en el genotipo HS-2, lo cual se relacione con un mayor NG en comparación a Promesa y Michoacan-21 (Cuadro 2). Esto corrobora, que las características agronómicas de los genotipos mejorados poseen un alto potencial productivo. Contrario a lo reportado por Aguilar *et al.* (2016) quien observaron una mejor respuesta en el RG y MS con el genotipo Promesa, posiblemente las

condiciones en las que se desarrollo el cultivo influyeron en la respuesta de los genotipos. En cuanto al IC, se observaron diferencias entre genotipos, siendo el más alto en Promesa, debido a que presentó la mayor distribución de MS hacia el grano. Esto indica, una mayor eficiente en la translocación de fotoasimilados hacia el grano.

Biofertilizante

El biofertilizante en los genotipos de maíz fovearecio la producción de MS, respecto a la nula aplicación, no así en el IC, lo que indica, un incremento en la producción de MS hacia el grano sin el biofertilizante. Con respecto al RG el más alto fue con biofertilizante, debido a que logró incrementar el NG, sin embargo, estadísticamente no se observaron diferencias significativas (Tabla 2). La incorporación de microorganismo al suelo, no favoreció la producción en el rendimiento de grano. Las condiciones hídricas en las que creció el cultivo pudieron afectar la respuesta del biofertilizante. Como lo señala, Grageda-Cabrera *et al.* (2012) que dentro de los factores ambientales que afectan la efectividad del biofertilizante son la temperatura y humedad. González-Mateos *et al.* (2018) reportaron incrementos del 5 y 12% en el RG de maíz con biofertilizante, respuestas mayores a los observados en el presente estudio.

Nitrógeno

En la Tabla 2 se observa que el nitrógeno ocasionó cambios significativos en la MS, IC, RG y sus componentes, a excepción del NGH. La aplicación de 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno incrementó en 9% la MS y en 51% el RG, en tanto con 80 kg ha⁻¹ de nitrógeno el aumento fue de 1.6% y en el RG fue del 33%, con respecto al testigo sin fertilizar, lo que indica que con 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno se promovió la mayor distribución de materia seca hacia el grano respecto al resto

de las estructuras de la planta. Cabe señalar, que el mayor IC también se observó con 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno, lo que corroborara el hecho de que existe una mayor translocación de fotoasimilados hacia el grano. Respuestas similares obtuvieron, Díaz *et al.* (2014) donde el máximo rendimiento de grano se obsevo a medida que fue incrementando el nitrógeno. Los componentes del rendimiento generaron una mejor respuesta cuando se aplico 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno, siendo el P100G y NG los de mayor relación con el RG. Esto indica que el suministro de nitrógeno es importante en la producción de grano, por ser el elemento de mayor demanda por la planta (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Genotipo x Biofertilizante (G x Bio)

El ANDEVA para la MS y RG, mostró diferencias significativas por efecto de la interacción G x Bio (Figura 3A y B); lo que demuestra que los genotipos presentaron respuestas diferentes a la aplicación del biofertilizante. Así, Michoacan-21 presentó un incremento del 40% en MS con la aplicación del biofertilizante y en Promesa el aumento fue del 14%, en contraste a HS-2 donde dicho comportamiento no se observa. Lo anterior indica que el mecanismo de respuesta en cuanto a la afinidad de los genotipos estudiados no está bien definido (Aguilar-Carpio *et al.*, 2015). En cuanto al RG (Figura 3B), en Michoacan-21 se observó un incremento del 24% con el uso de biofertilizante. Esto indica que el cultivo es más eficiente en la producción de MS hacia el grano por efecto del biofertilizante; lo anterior posiblemente generó un estímulo en el desarrollo de la raíz y del dosel vegetal, que es un factor importante en el llenado de grano. Como también se deduce de los estudios realizados por Díaz *et al.* (2008). Es importante señalar, que en el genotipo HS-2 no se registró una respuesta positiva con el uso del biofertilizante. Lo que indica, que los microorganismos utilizados presentaron respuestas dife-

Tabla 2. Materia seca total (MS), índice de cosecha (IC), rendimiento de grano (RG) y sus componentes en genotipos de maíz en función del biofertilizante (Sin y Con) y nitrógeno.

Table 2. Total dry matter (DM), harvest index (HI), grain yield (GY) and its components in corn genotypes as a function of biofertilizer (with and without) and nitrogen.

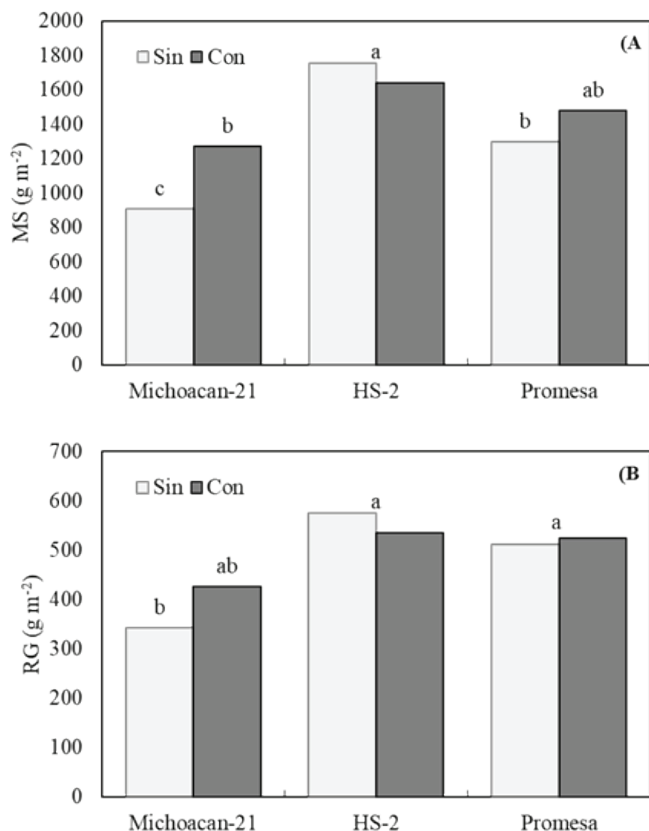
Factor		MS	IC	RG	P100G	NH	NGH	NG
		g m ⁻²	%	g m ⁻²	g			m ²
Genotipo	Michoacán-21	1,090 c	35 a	385 b	41 b	15 a	27 b	2,598 b
	HS-2	1,698 a	32 b	556 a	43 a	15 a	29 a	2,964 a
	Promesa	1,387 a	37 a	518 a	43 a	15 a	29 a	2,818 a
	Tukey (DMS)	85	5	38	1.0	0.9	1.3	203
Bio	Sin	1,320 b	43 a	577 a	42 a	14 a	29 a	2,694 a
	Con	1,463 a	40 b	595 a	42 a	15 a	29 a	2,893 a
	Tukey (DMS)	93	2.9	48	1.8	0.9	1.3	273
Nitrogeno (kg ha ⁻¹)	0	1,343 b	28 b	379 c	41 b	14 b	28 a	2,593 b
	80	1,365 ab	37 b	507 b	43 a	16 ab	29 a	2,861 a
	160	1,466 a	39 a	573 a	43 a	16 a	30 a	2,926 a
	Tukey (DMS)	114	3.7	55	1.8	1.0	1.4	225
CV. (%)		11	15	11	6	9	7	11

En columnas para cada factor principal letras similares indican que los valores son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). Bio = Biofertilizante.

rentes entre genotipos, esto posiblemente se relaciona con las condiciones ambientales en que se desarrollo el cultivo, como lo señalan Martínez *et al.* (2018) quienes no observaron respuesta significativa con el uso de biofertilizante, en el rendimiento de grano.

Figura 3. (A) Materia seca total (MS) y (B) rendimiento de grano (RG) en genotipos de maíz en función del biofertilizante (Sin y Con).

Figure 3. (A) Total dry matter (DM) and (B) grain yield (GY) in corn genotypes as a function of biofertilizer (with and without).



Genotipo x Nitrógeno (G x N)

En la Figura 4 se observa que los genotipos presentaron respuesta diferente al nitrógeno en la MS y RG. En general dicha respuesta se ajustó al modelo de un polinomio de segundo grado. El genotipo Michoacan-21 y Promesa mostraron la respuesta más alta al N con una producción de MS de 2.7 y 2.6 g m⁻² por unidad de N aplicado, respectivamente, seguido de HS-2 que produjo la respuesta más baja (1.7 g m⁻²) al nitrógeno. Esto señala, la eficiencia de los genotipos para producir MS y su relación con la asimilación de nitrógeno. En los tres genotipos evaluados se observó que la máxima producción de MS se logró con 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno, siendo, el genotipo HS-2 donde se registraron los mayores valores de MS. Lo anterior, indica que la generación de materia seca está directamente relacionada con la disponibilidad y aprovechamiento del nitrógeno en el suelo (Azcón-Bieto y Talón, 2008). En lo referente al RG, también se observó diferencia entre genotipos, así como la respuesta al N (Figura 4B). Michoacan-21 y HS-2 presentaron el mayor RG por unidad de N aplicado

(2.3 y 2.2 g m⁻², respectivamente) seguido de Promesa (1.4 g m⁻² por kg N aplicado). Esto indica que Michoacan-21 y HS-2 son más eficiente en el uso de nitrógeno, para la producción de MS en el grano. Cabe señalar, que el RG más alto se obtuvo con la combinación de HS-2 y 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno. En general el N incrementó el rendimiento en los genotipos, por ser el elemento más relevante en el crecimiento, floración y llenado de grano (Sosa-Rodriguez *et al.*, 2018). Tendencias similares han sido reportadas por De la Cruz-Lázaro *et al.* (2009) y Mani-Pati *et al.* (2010).

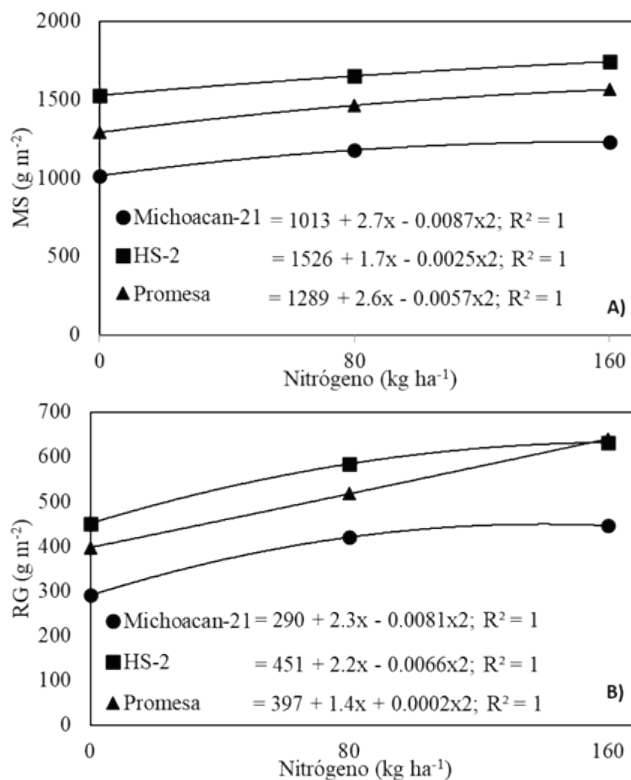


Figura 4. (A) Materia seca total (MS) y (B) rendimiento de grano (RG) en genotipos de maíz en función del nitrógeno (N).

Figure 4. (A) Total dry matter (DM) and (B) grain yield (GY) in corn genotypes based on nitrogen (N).

Biofertilizante x Nitrógeno (Bio x N)

En la Figura 5A y B, se observa que la aplicación del biofertilizante promovió una mejor respuesta en la MS, contrario al RG donde no observó diferencias en el suministro del biofertilizante. La materia seca total presentó un crecimiento progresivo en función del incremento del nitrógeno. Las tendencias de la materia seca en los tres niveles de nitrógeno se ajustaron a un modelo cuadrático. Así, la producción de MS por unidad de nitrógeno aplicado fue de 2.1 g m⁻² cuando se utilizó el biofertilizante, el cual superó a la nula inoculación (1.2 g m⁻²). Lo anterior, indica que la generación de materia seca está directamente relacionada con la disponibilidad y aprovechamiento de los nutrientes y microorganismos en el suelo, con lo cual, resulta una mejor actividad fotosintética que causa un mayor crecimiento de la planta (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Las plantas con la mayor producción de grano se observaron al aplicar 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno, independien-

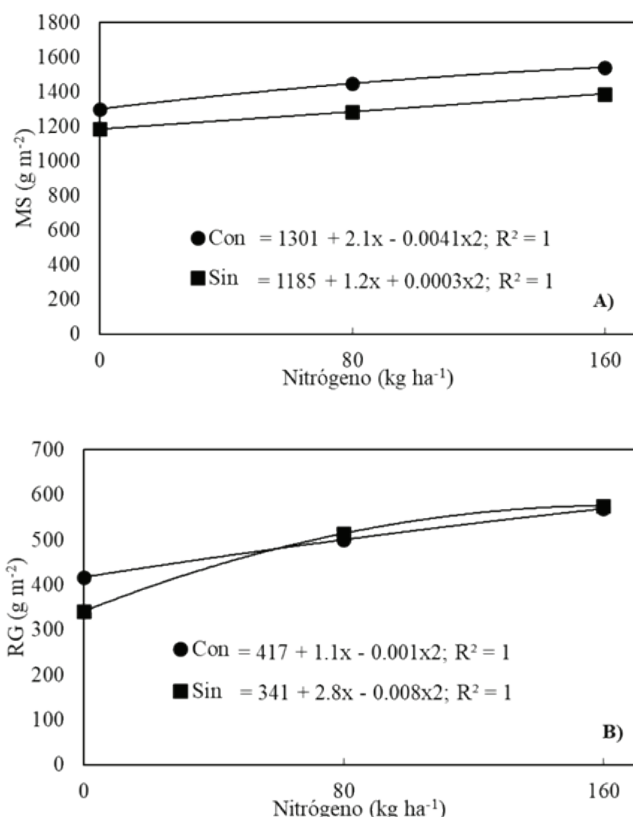


Figura 5. (A) Materia seca total (MS) y (B) rendimiento de grano (RG) en función del biofertilizante (Con y Sin) y nitrógeno.
Figure 5. (A) Total dry matter (DM) and (B) grain yield (GY) as a function of biofertilizer (with and without) and nitrogen.

temente de la aplicación del biofertilizante. y con una tasa de incremento de 2.8 g m⁻² por kg de N aplicado, lo anterior sin el biofertilizante (Figura 5B). Cabe señalar, que a medida que se iba incrementando el nitrógeno, también el rendimiento de grano aumentaba. Este comportamiento, puede atribuirse a una mayor disponibilidad y aprovechamiento nutricional, lo cual influye directamente sobre la producción del grano. Por su parte, Díaz *et al.* (2008) registraron un incremento en el rendimiento de maíz con la combinación de nitrógeno y biofertilizante.

Genotipo x Biofertilizante x Nitrógeno (G x Bio x N)

En la Figura 6A, se observa que la mayor respuesta en MS se encontró sin Bio para HS-2, seguido de Promesa y Michoacan-21, lo cuales, presentaron un incremento de MS con la aplicación del biofertilizante. Esto indica, una respuesta diversa en el uso del biofertilizante, al no influyó de forma concluyente en el crecimiento y producción de materia seca en la planta de los diferentes genotipos evaluados. Es importante mencionar, que el genotipo HS-2 y la aplicación de nitrógeno (160 kg ha⁻¹) generó la mayor MS respecto a los demás genotipos y niveles de nitrógeno utilizados. Tendencias similares fueron observadas por Ayvar *et al.* (2020) quienes no registraron diferencias en la aplicación de la fertilización química en asociación con biológicos sobre la materia seca de diferentes genotipos de maíz. Con respecto al RG el más

alto correspondió a la aplicación de 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno sin el uso del biofertilizante en Promesa y HS-2, seguido de Michoacan-21, en donde si se observó un efecto benéfico del biofertilizante. Los factores responsables de dicha respuesta son difíciles de identificar, pero se atribuye a la afinidad del genotipo, condiciones ambientales en las que se desarrolló el cultivo, propiedades fisicoquímicas del suelo y manejo agronómico (Armenta *et al.*, 2010). Al respecto, Gonzalez-Mateos *et al.* (2018) no observaron una respuesta contundente en el rendimiento de grano con el uso del biofertilizante en diferentes regiones y genotipos para Guerrero, México.

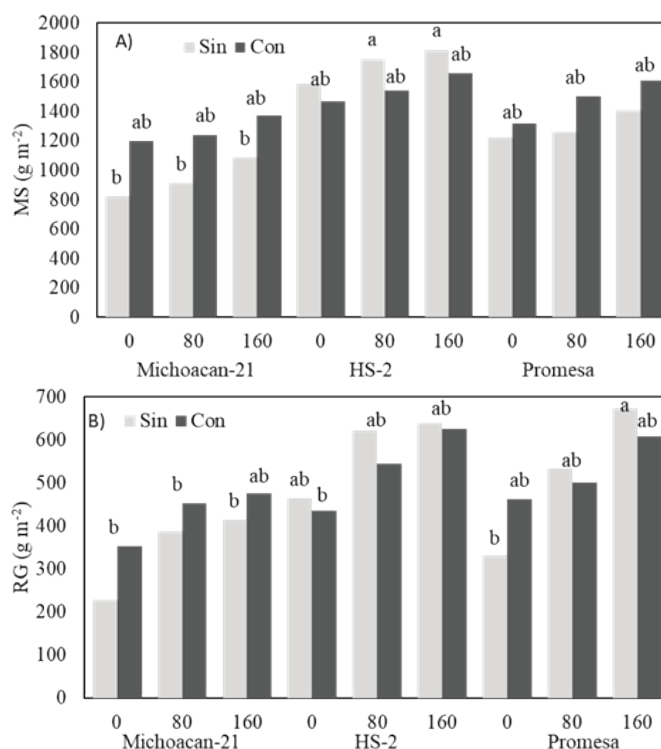


Figura 6. (A) Materia seca total (MS) y (B) rendimiento de grano (RG) en función del genotipo, biofertilizante (Con y Sin), y nitrógeno.
Figure 6. (A) Total dry matter (DM) and (B) grain yield (GY) as a function of the genotype, biofertilizer (with and without) and nitrogen.

Análisis económico

En cuanto al análisis económico (Tabla 3), el mayor RG se observó en Promesa sin biofertilizante con la aplicación de 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno, lo cual generó el más alto IN, sin embargo, la mayor GPI se presentó en HS-2, sin Bio y 80 kg ha⁻¹ de nitrógeno, ya que, por cada peso invertido, se recuperó \$ 2.56. El costo total más alto en la producción de maíz fue con Promesa y HS-2 en asociación con el biofertilizante y 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno. Cabe recalcar, que los elevados costos de los insumos para la producción en el cultivo de maíz hacen que sea cada vez menos rentable para los productores. Por lo que, para agricultores de capital limitado se recomienda el uso de Promesa, debido a que genera el mayor IN sin el uso de biofertilizante. Al respecto, Ayvar *et al.* (2020) realizaron un análisis económico entre genotipos de maíz y asociación con la fertilización química y biológica, en donde observaron un

incremento en el IT, IN y GPI. En base a lo anterior se puede inferir que el IN está en función de los genotipos e insumos utilizados.

CONCLUSIONES

La aplicación de biofertilizante y nitrógeno ocasionó incrementos en la producción de materia seca total, rendimiento de grano y sus componentes en función del genotipo utilizado. Michoacan-21 presentó un efecto positivo con el uso de biofertilizante en la materia seca total y en el rendimiento de grano. En general, la mayor materia seca total se logró con la aplicación de 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno en el genotipo HS-2 y en el caso del rendimiento de grano el más alto fue con Promesa y nitrógeno a 160 kg ha⁻¹, el cual presentó el mayor ingreso neto y total.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización del presente estudio de investigación.

REFERENCIAS

- Aguilar-Carpio, C., Escalante-Estrada, J. A. S., Aguilar-Mariscal, I., Mejía-Contreras, J. A., Conde-Martínez, V. F. y Trinidad-Santos, A. 2015. Rendimiento y rentabilidad de maíz en función del genotipo, biofertilizante y nitrógeno, en clima cálido. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 18: 151-163.
- Aguilar, C. C., Escalante, E. J. A. S., Aguilar, M. I., Mejía, C. J. A., Conde, M. V. F. y Trinidad, S. A. 2016. Eficiencia agronómica, rendimiento y rentabilidad de genotipos de maíz en función del nitrógeno. *Terra Latinoamericana*. 34: 1-11.
- Aguilar-Carpio, C., Escalante-Estrada, J. A. S., Aguilar-Mariscal, I. y Pérez-Ramírez, A. 2017. Crecimiento, rendimiento y rentabilidad del maíz VS-535 en función del biofertilizante y nitrógeno. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 4: 475-483.
- Armenta, B. A. D., García, C. G., Camacho, J. R. B., Apodaca, M. A. S., Montoya, L. G. y Nava, E. P. 2010. Biofertilizante en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. 6: 51-56.
- Ayvar-Serna, S., Díaz-Nájera, J. F., Vargas-Hernández, M., Mena-Bahena, A., Tejeda-Reyes, M. A. y Cuevas-Apresa, Z. 2020. Rentabilidad de sistemas de producción de grano y forraje de híbridos de maíz, con fertilización biológica y química en trópico seco. *Terra Latinoamericana*. 38: 9-16.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2a ed.). McGRAW-HILL – INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A. U. 651 p.
- De la Cruz-Lazaro, E., Códova-Orellana, H., Estrada-Botello, M. A., Mendoza-Palacios, J. D., Gómez-Vázquez, A. y Brito-Manzano, N. P. 2009. Rendimiento de grano de genotipos de maíz sembrados bajo tres densidades de población. *Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo*. 25: 93-98.
- Díaz, F. A., Salinas, J. R. G., Garza, I. C. y Mayek, N. P. 2008. Impacto de labranza e inoculación micorrízica arbuscular sobre la pudrición carbonosa y rendimiento de maíz en condiciones semiáridas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 257-263.
- Díaz, F. A., Ortiz, C. F. E., Lozano, C. M., Aguado, S. A. y Grageda, C. O. 2013. Growth, mineral absorption and yield of maize inoculated with microbe strains. *African Journal of Agricultural Research*. 8: 3764-3769.
- Díaz, V. T., Partidas, R. L., Suárez, F. Y. E., Lizárraga, J. R. y López, L. A. 2014. Uso eficiente del agua y producción óptima en maíz, con el uso de cuatro dosis de nitrógeno. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 23: 32-36
- Doorenbos, J. y W. O. Pruitt. 1986. Las necesidades de agua por los cultivos. Estudio FAO. Riego y Drenaje. Manual 24.
- García E. 2005. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 4ª Edición. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México. 217 p.
- García-Olivares, J. G., Moreno-Medina, V. R., Rodríguez-Luna, I. C., Mendoza-Herrera, A. y Mayek-Pérez, N. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30: 305-310.
- Gómez, M. N. O., Cantú, A. M. A., Hernández, G. C. A., Vázquez, C. M. G., Aragón, C. F., Espinosa, C. A. y Palemón, A. F. 2014. V-237 AN, cultivar mejorado de maíz "Ancho Pozolero" para la región semicálida de Guerrero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7: 1315-1319.
- González-Mateos, R., Noriega-Cantú, D. H., Volke-Haller, V. H., Pereyda-Hernández, J., Domínguez-Márquez, V. M. y Garrido-Ramírez, E. R. 2018. Rendimiento de maíz (*Zea mays* L.) y respuesta a fuentes y dosis de fertilizantes, y biofertilizantes, en Guerrero, México. *Agroproductividad*. 11: 22-31.
- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J. y Vera-Núñez, J. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 1261-1274.
- Khaliq, T., Ahmad, A., Hussain, A. y Ali, M. A. 2009. Maize hybrids response to nitrogen rates at multiple locations in semiarid environment. *Pakistan Journal of Biological*. 41: 207-224.
- Mani-Pati, F., Clay, D. E., Carlson, C. G., Clay, S. A., Reicks, G. y Kim, K. 2010. Nitrogen rate, landscape position and harvesting of corn stover impacts on energy gains and sustainability of corn production systems in South Dakota. *Agronomy Journal*. 102: 1535-1541.
- Martínez, R. L., Aguilar, J. C. E., Carcaño, M. M. G., Galdámez, G. J., Gutiérrez, M. A., Morales, C. J. A., Martínez, A. F. B., Llaven, M. J. y Gómez, P. E. 2018. Biofertilización y fertilización química en maíz (*Zea mays* L) en Villaflores, Chiapas, México. *Siembra*. 5: 26-37.
- Pecina-Martínez, J. A., Mendoza-Castillo, M. C., Lopez-Santillán, J. A., Castillo-Gonzalez, F. y Mendoza-Rodriguez, M. 2009. Respuesta morfológica y fenológica de maíces nativos de Tamaulipas a ambientes contrastantes de México. *Agrociencia*. 43: 681-694.
- Ritchie, S. W. y Hanway, J. J. 1982. How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service. Special report No. 48. Ames Iowa, EEUU. 21 p.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT user's guide Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Sistema de Información Agropecuaria (SIAP). 2020. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. SAGARPA. México. Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comanuar.html (Revisado: 12 septiembre de 2021).
- Sosa-Rodrigues, B. A y Garcia-Vivas, Y. S. 2018. Eficiencia de uso del nitrógeno en maíz, fertilizado de forma orgánica y mineral. *Agronomía Mesoamericana*. 29: 2216-3608.
- Snyder, R. L. 1985. Hand calculating degree-days. *Agricultural and Forest Meteorological*. 35: 353-358.
- Villalpando, I. J. F. y Ruíz, C. J. A. 1993. Observaciones agrometeorológicas y su uso en la agricultura. Primera Ed. México; Editorial Limusa.

Composición química, digestibilidad y rendimiento de *Brachiaria decumbens* a diferentes edades de rebrote

Chemical composition, digestibility and performance of *Brachiaria decumbens* at different ages of recovery

Reyes-Pérez JJ¹, Méndez-Martínez Y¹, Espinosa-Cunuhay KA², Bastidas-Espinoza RL³, Apolo-Bosquez JA³, Ramírez de la-Ribera JL⁴, Ruiz-Espinoza FH^{5*}

¹ Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito. Km 1 ½ vía a Santo Domingo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

² Universidad Técnica de Cotopaxi. Extensión La Maná. Av. Los Almendros y Pujilí, Edificio Universitario, La Maná, Ecuador.

³ Instituto Tecnológico Superior Ciudad de Valencia, Km 1.5 via a Valencia, sector el Pital, parroquia San Cristobal, Quevedo, Los Rios, Ecuador.

⁴ Universidad de Granma. Km 17 ½, Carretera vía a Manzanillo, Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba.

⁵ Universidad Autónoma de Baja California Sur, Carretera al Sur Km 5.5., La Paz, Baja California Sur, México.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la composición química, digestibilidad y rendimiento de *Brachiaria decumbens* a diferentes edades de rebrote. Las épocas fueron; poco lluvioso (Enero-Abril) y lluvioso (Julio-October). Los tratamientos (edades de rebrote: 30, 45, 60, 75, 90 y 105 días) se distribuyeron en un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas. La materia seca (MS) presentó valores superiores ($p \leq 0.01$), a los 60 días con 6.05 y 1.83 t MS ha⁻¹ para el lluvioso y poco lluvioso. La proteína bruta ($p \leq 0.01$) en ambos períodos se reflejó a los 30 días, 11.82 % para el lluvioso y 12.28 % para el poco lluvioso. La digestibilidad mostró los porcentajes mayores ($p \leq 0.001$) a los 30 días en lluvias y pocas lluvias, con 57.9 y 61.13%. La composición química, digestibilidad y rendimiento de *Brachiaria decumbens* fue influenciada de forma directa por las diferentes edades de rebrote, al aumentar la producción de la planta y disminuir su calidad. Se obtuvieron ecuaciones de regresión cuadráticas y cúbicas (coeficientes superiores a 0.72) que establecieron una estrecha relación con la edad y los indicadores del rendimiento, la composición química y digestibilidad.

Palabras claves: digestibilidad de materia orgánica, gramíneas, lignina detergente ácida, hemicelulosa.

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the chemical composition, digestibility and yield of *Brachiaria decumbens* at different regrowth ages. The times were; little rainy (January-April) and rainy (July-October). The treatments (regrowth ages: 30, 45, 60, 75, 90 and 105 days) were distributed in a randomized block design with four replications. The dry matter (DM) presented higher values ($p \leq 0.01$), at 60 days with 6.05 and 1.83 t DM ha⁻¹ for the rainy and dry season. The crude protein ($p \leq 0.01$) at both periods was reflected at 30 days, 11.82% for the rainy season and 12.28% for the dry season. The digestibility showed the highest percentages ($p \leq 0.001$) at 30 days in rains and little rains, with 57.9 and 61.13%. The chemical composition, digestibility and yield of *Brachiaria decumbens* were directly influenced by the diffe-

rent regrowth ages, increasing the production of the plant and decreasing its quality. Quadratic and cubic regression equations (coefficients greater than 0.72) were obtained, which established a close relationship with age and performance indicators, chemical composition and digestibility.

Keywords: digestibility of organic matter, grasses, acid detergent lignin, hemicellulose.

INTRODUCCIÓN

Los pastos y forrajes en los sistemas de producción de rumiantes, en la mayor parte del trópico, aportan del 80 al 90 % de los nutrientes requerido por los animales. Ellos constituyen la opción más económica para la alimentación de los bovinos y no compiten directamente con la alimentación del hombre, pues generalmente se utilizan para su fomento tierras poco productivas o no aptas para otros cultivos (Ledea, 2016). Aunque se conoce el efecto positivo de especies mejoradas en la productividad de los sistemas ganaderos, los esfuerzos no siempre significan aumento en la producción animal, debido a que influyen negativamente factores como: la adaptación de las especies a diferentes condiciones ambientales, el acceso a los fertilizantes y el manejo entre otros (Cruz *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2021). El objetivo final del establecimiento de pasturas es mejorar el sistema de producción animal. Sin embargo, su ingreso a este implica considerable esfuerzo financiero en su implantación, realizando gastos de laboreo del suelo, fertilización y compra de semillas, entre otros aspectos (Ledea *et al.*, 2018).

En general, la pastura cultivada produce mayor cantidad y mejor calidad de forraje que la pradera natural, permite mayor carga, aumentando así la producción de leche y carne por unidad de superficie (Avilés *et al.*, 2021). Bajo este precepto, y con el afán de mejorar la producción animal, se han establecido diversos cultivares del género *Brachiaria* en algunas regiones de México y otros países de Centroamérica que permitieron aumentar la productividad del ganado en 26 % para la leche y 6 para la carne, sustentándose estos valores por los altos rendimientos y calidad del forraje producido (Argel, 2006). El género *Brachiaria* se caracteriza como

*Autor para correspondencia: Francisco Higinio Ruiz Espinoza

Correo electrónico: fruiz@uabcs.mx

Recibido: 1 de noviembre de 2021

Aceptado: 31 de enero de 2022

una fuente apropiada para la producción bovina a partir de la capacidad del rumiante de utilizar alimentos fibrosos. En condiciones de clima tropical se han referido producciones de varias especies de dicho género que oscilan entre los 8 y 10 t MS ha año⁻¹, atendiendo estas respuestas productivas, a factores como, la fertilidad del suelo y precipitaciones, condiciones que potencian o deprimen el potencial forrajero del vegetal (Fernández *et al.*, 2015 y Rojas-García *et al.*, 2018).

Las condiciones climáticas predominantes en la región oriental de Cuba, caracterizadas por las escasas e irregular distribución de las lluvias, y variaciones de temperatura y radiación solar, provocan la disminución drástica de los rendimientos de materia seca y calidad de los pastos, principalmente en el período poco lluvioso (meses de noviembre y abril). Esto ocasiona disponibilidad reducida de alimento para el ganado vacuno, lo que limita la producción de leche y carne (Fernández *et al.*, 2004). Además, la calidad nutricional también cambia rápidamente, ya que con la edad experimentan modificaciones sensibles y graduales en su composición química, lo que afecta de forma general la producción animal (Ramírez *et al.*, 2012; Ledea *et al.*, 2018).

Para atenuar esta situación, se han introducido nuevas especies resistentes a la sequía, con mayor potencial productivo y mejor calidad, como la *Brachiaria decumbens*. Sin embargo, no se conoce con exactitud su comportamiento en estas condiciones climáticas, ni el efecto que produce la edad de rebrote en su rendimiento y calidad. Por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar la composición química, digestibilidad y rendimiento de *Brachiaria decumbens* a diferentes edades de rebrote en un suelo Fluvisols de la región oriental de Cuba, así como establecer la relación funcional de la edad con los indicadores del rendimiento y la composición química, a través de ecuaciones de regresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización, clima y suelo

El experimento se desarrolló en la Empresa Agropecuaria de Bayamo, localizada en la provincia de Granma, en la región oriental de Cuba. En el área experimental para el período poco lluvioso (enero-abril) se registraron valores de precipitaciones, temperatura media, mínima y máxima de 140 mm, y 24.4; 18.3 y 30.2°C, respectivamente, la humedad relativa promedió 72 %. En el período lluvioso (julio-octubre) los valores de precipitación fueron de 789 mm y 27.3°C, 23.7°C, 33°C y 80 %, de temperatura media, mínima, máxima y humedad relativa, respectivamente. Los valores promedios de los últimos cinco años en estos dos períodos en el lugar

donde se desarrolló el experimento aparecen en la siguiente (Tabla 1)

El suelo presente es Fluvisols según FAO (2015), se sustenta sobre materiales transportados carbonatados o no, su contenido de materia orgánica varía desde medianamente humificado (2,0-4,0 %) hasta poco humificado (<2,0 %), su textura es muy variable desde un Loams arcilloso, una arcilla ligera, hasta un Loams arenoso, lo que induce variación en sus propiedades físicas y químicas (Tabla 2). La profundidad efectiva tiene rangos de variación desde profundos (91-150 cm) hasta poco profundos (25-50 cm). Generalmente su fertilidad natural es baja, pero son muy productivos cuando se trabajan correctamente (Ramírez *et al.*, 2012).

Tratamientos y diseño experimental

Se empleó un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas para cada una de las edades en estudio en las dos épocas evaluadas. Los tratamientos consistieron en las edades de rebrote 30, 45, 60, 75, 90 y 105 días, para los períodos lluvioso y poco lluvioso.

Procedimiento

Para estudiar las diferentes edades de rebrote de la *Brachiaria decumbens* se utilizó un área establecida de 4 años, con dimensiones de 1,600 m². Al inicio de la evaluación en cada período (lluvioso en julio y poco lluvioso en enero) se realizó un corte de uniformidad a 10 cm del suelo, empleando una cortadora de césped SOLO Kleinmotoren GmbH modelo 589 de fabricación alemana. Para tomar las muestras se delimitaron parcelas de 25 m² correspondientes a las edades de rebrote (30, 45, 60, 75, 90 y 105 días) con 50 cm por cada lado para disminuir el efecto de borde. El área no se regó ni fertilizó durante el experimento. Las parcelas estaban constituidas por 96% del pasto evaluar, 4% de gramíneas pertenecientes al género *Dichantium*. Las parcelas de 25 m² se cortaron en el momento de evaluación de cada edad de rebrote, el contenido se pesó y se trasladó al laboratorio. Los muestreos se realizaron entre las 8 y las 10 am. El rendimiento se determinó mediante el corte total de la parcela en cada tratamiento (Herrera, 2006). Posterior al peso en verde de la parcela total, se separaron las hojas y los tallos verdes y se pesaron de forma individual, el material muerto que apareció a partir de la edad 60 fue desechado. Posteriormente se secaron, lo que permitió determinar la proporción de tallos y hojas según Herrera (2006).

Tabla 1. Valores promedios de las variables climáticas en los últimos cinco años.

Table 1. Average values of the climatic variables in the last five years.

Períodos	Humedad Relativa %	Temperatura Mínima °C	Temperatura Media °C	Temperatura Máxima °C	Precipitaciones mm
Lluvioso (julio-octubre)	71	18.9	24.3	30.7	135
Poco lluvioso (enero-abril)	81.25	23.6	27.3	32.9	768

Fuente: CITMA (2020).

Tabla 2. Composición química del suelo en el área experimental.
Table 2. Chemical composition of the soil at the experimental area.

pH	mg/100g de suelo			MO %
	P ₂ O ₅	K ₂ O	Nitrógeno total	
6.2	2.5	38.5	34	3.2

Análisis químicos

Las muestras húmedas se secaron en una estufa de circulación de aire a 65°C durante 72 h para determinar la materia seca según (AOAC, 2016). Posteriormente se pesaron y se utilizaron 200g para los restantes análisis realizados. Se determinaron las variables proteína bruta (PB), fósforo (P) y calcio (Ca) (Latimer, 2016). La fibra detergente neutra (FDN), lignina detergente ácida (LDA) y fibra detergente ácido (FDA), así como la celulosa y hemicelulosa según Goering y Van Soest (1970).

Digestibilidad ruminal *in situ*

Para determinar la digestibilidad de la materia seca y orgánica se empleó el método de Orskov y McDonald (1979) utilizando dos bovinos canulados de 400 kg de peso, de la raza Criolla Cubana, los que se trataron contra ectoparásitos y endoparásitos antes de iniciar la prueba, los animales permanecieron en cubículos individuales y se les suministró como dieta base pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) y *Brachiaria decumbens*, el agua y sales minerales se ofrecieron *ad libitum*. Las muestras de cada edad de rebrote se incubaron en cada animal, utilizando un blanco y seis bolsas con muestras de la planta, para esto fueron molidas a 2 mm de espesor. La materia orgánica (MO) se determinó por incineración en mufla a 550 °C durante 24 h (Latimer, 2016).

Análisis estadístico

Para la distribución normal de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Massey, 1951) y para la homogeneidad de las varianzas la prueba de Bartlett (1937). Se realizaron análisis de varianza de clasificación doble en cada período climático según las exigencias del diseño experimental. Las medias resultantes del ANVA se compararon atendiendo el criterio de Keuls (1952). Se determinó la potencia estadística para la prueba realizada, partiendo de una significación predeterminada para ($P \leq 0.01$).

Para establecer la relación funcional de la edad con los indicadores del rendimiento y la edad, se emplearon según método descendente ecuaciones de regresión lineal (lineales, cuadráticas y cúbicas). Para la selección de la ecuación de mejor ajuste se consideró alto valor de R², alta significación, bajo error estándar de los términos y de estimación, menor cuadrado medio del error, aporte significativo de los términos de la ecuación y coeficiente de determinación bajo ($1-R^2$) según Guerra *et al.* (2003). Se determinó el factor de inflación de la varianza, para la variable incluida en los modelos. Se empleó el programa SPSS (2012) para Windows. Cada época se analizó por separado, no fue objetivo compararlas entre ellas.

RESULTADOS

La potencia estadística reflejó un valor de 0.95, lo que indica que hay diferencia significativa. Así, se determinó que las varianzas fueron homogéneas y los datos se distribuyeron normalmente. Por tanto, la investigación reflejó que el rendimiento aumentó conforme avanzó la edad de rebrote, el valor significativamente superior ($P \leq 0.001$) se obtuvo en la edad de 75 días con 5.71 tMS ha⁻¹. Para el porcentaje de hojas ocurrió lo contrario, este disminuyó con el aumento de la edad de rebrote, a los 30 días se observó el mayor valor ($p \leq 0.001$) (Tabla 3). El porcentaje de tallos fue similar al rendimiento y contrario al de las hojas, mostrando diferencias significativas entre cada edad contemplada en el estudio, excepto para las edades de 90 y 105.

En el período poco lluvioso se observó, aunque de una forma discreta, que el rendimiento de materia seca aumentó conforme avanzó la edad de la planta, y aunque no se compararon las épocas, se obtuvieron valores numéricos que indican una reducción de la productividad en este período. A los 60 días se obtuvo el pico de producción de MS con 1.83 t MS ha⁻¹, este valor se diferenció ($P \leq 0.001$) del resto de los promedios en todas las edades consideradas en el estudio. Luego de los 60 días los rendimientos se redujeron de forma significativa. Sin embargo, los porcentajes de hojas, a pesar de su reducción progresiva ($p \leq 0.001$) en función del incremento de la edad, se mantuvieron por encima del 50%, mientras que los tallos, el mayor lo presentaron a los 90 días de rebrote con 33.86 %. Denotando un equilibrio aceptable entre la proporción de hojas/tallos, lo que tributa a RMS con calidad, pero que comienza a deteriorarse en función de las proporciones mencionadas a los 90 días de rebrote (Tabla 3).

El cálculo del factor de inflación de la varianza en los modelos se determinó, el valor reflejó 1.66. Valores mayores de 10 representan un potencial deterioro del modelo por efecto de la multicolinealidad. Al establecer la relación funcional entre la edad y los indicadores del rendimiento se comprobó que, las tres variables evaluadas mostraron ajustes

Tabla 3. Indicadores agronómicos en el *Brachiaria decumbens* según la edad de rebrote en dos períodos climáticos.

Table 3. Agronomic indicators in *Brachiaria decumbens* according to regrowth age at two climatic periods.

Edad (días)	Período lluvioso			Período poco lluvioso		
	RMS t MS ha ⁻¹	Hojas (%)	Tallos (%)	RMS t MS ha ⁻¹	Hojas (%)	Tallos (%)
30	1.68 ^f	71.34 ^a	28.56 ^e	0.35 ^f	72.68 ^a	27.12 ^f
45	3.89 ^e	52.77 ^b	44.26 ^d	0.88 ^e	70.05 ^b	28.30 ^e
60	6.05 ^c	36.19 ^c	51.37 ^c	1.83 ^a	61.42 ^c	30.28 ^d
75	5.71 ^a	34.12 ^d	53.49 ^b	1.68 ^b	58.68 ^d	31.87 ^c
90	5.08 ^b	31.37 ^e	55.42 ^a	1.36 ^c	54.63 ^e	33.86 ^a
105	4.70 ^d	28.60 ^f	57.27 ^a	1.06 ^d	51.43 ^f	36.71 ^b
EE±	0.30	3.14	2.03	0.11	1.60	0.68
P	0.001					

Letras desiguales en una misma columna difieren según Keuls (1952).

con ecuaciones de regresión cuadrática en ambos períodos, con coeficientes de determinación en lluvias de 0.93 y 0.98, y entre 0.89 y 0.99 en pocas lluvias, en ambos se obtuvieron bajos errores estándar y alta significación (Tabla 4).

En el período lluvioso la proteína bruta disminuyó de forma significativa ($p \leq 0.01$) hasta los 45 días, aunque continuó disminuyendo en el intervalo entre 60 y 90 días no hubo diferencias ($p \geq 0.05$), solo se registró variación ($p \leq 0.01$) hacia la disminución a los 105 días de rebrote. La FDN y FDA, presentaron el valor significativamente superior a los 105 días, sin embargo, el patrón de concentración en función de la edad varió para la FDN, esta luego de disminuir entre 30 y 45 días, aumentó a los 60 y 75 días de rebrote de forma significativa ($p \leq 0.05$), para a los 90 días disminuir y posteriormente aumentar a los 105 días. La FDA fue más estable químicamente, ya que se comportó en concentración ascendente ($p \leq 0.01$) en función de la edad de la planta (Tabla 5).

La lignina reflejó diferencias ($p \leq 0.01$) entre todas las edades estudiadas, el porcentaje más alto se obtuvo a los 105 días de rebrote al igual que la celulosa, este homopolisacárido entre 60 y 90 días manifestó concentraciones que se relacionaron con la edad intermedia independientemente de manifestar diferencias ($p \leq 0.01$) entre las dos edades mencionadas y el resto de las evaluadas en el estudio.

Para la hemicelulosa las concentraciones fueron variables en función del crecimiento y desarrollo de la planta, se incrementó desde 45 hasta 60 días, edad donde se obtuvo el mayor ($p \leq 0.01$) tenor, para luego mantenerse con incrementos y reducciones de su contenido en el tejido vegetal que marcaron diferencias ($p \leq 0.01$) entre las edades evaluadas (Tabla 5). Para la DMS y DMO, los porcentajes disminuyeron con la edad de rebrote, para DMS se observaron degradaciones por encima del 50 % hasta los 75 días de edad, mientras que para la DMO estas se mantuvieron hasta la última edad contemplada en este estudio. Para DMS las degradaciones oscilaron entre 57.09 y 50.09 % y 61.10 y 50.67 % respectivamente.

El contenido de fósforo disminuyó en función del incremento de la edad de la planta, con respecto a las concentraciones encontradas a los 30 días se obtuvo la mayor ($p \leq 0.001$) concentración, lo contrario sucedió para el calcio, este mostró entre 90 y 105 días de rebrote su mayor contenido para $p \leq 0.001$.

Para los indicadores químicos, estos se determinaron en la edad de rebrote para los dos períodos estacionales, además, se establecieron mediante ecuaciones de regresión las relaciones funcionales entre edad de rebrote e indicadores químicos.

Para la PB, FDN, FDA, LDA, Celulosa, Hemicelulosa y el P, se ajustaron ecuaciones de regresión cúbica con coeficientes de determinación superiores a 0.72, con errores bajos y significación alta (Tabla 6). Para las variables DMS, DMO y el Ca se ajustaron ecuaciones de regresión cuadrática con coeficientes altos superiores a 0.93, nuevamente los errores estándar fueron bajos.

En el período poco lluvioso la PB disminuyó ($p \leq 0.001$) con la edad de la planta, el mayor valor se obtuvo a los 30 días (12.28 %), mientras que la FDN y FDA se incrementaron en función de la edad. La FDN no mostró diferencias entre los 75 y 90 días, luego aumentó significativamente ($p \leq 0.01$) a los 105 días. La FDA mostró su concentración mayor a los 105 días, entre todos los tratamientos se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) (Tabla 6). Por su parte, la lignina incrementó su concentración de forma significativa a partir de los 60 días.

La DMS y DMO disminuyeron en función del incremento de la edad de rebrote, los valores significativamente superiores ($p \leq 0.01$) se obtuvieron a los 30 días de edad en ambas degradabilidades, es importante destacar que, aunque entre cada edad significaron diferencias ($p \leq 0.01$), para la DMS hasta los 75 días se obtuvieron degradabilidades superiores a 50 %, mientras que, para la DMO, se mantuvieron por encima del valor comentado hasta los 105 días de edad.

Las concentraciones de fósforo, aunque disminuyeron con la edad de la planta de forma gradual, entre las edades 30 y 45; 65 y 70; y 90 y 105 días no se observaron diferencias ($p \geq 0.05$), solo entre los pares de estas edades se mostraron las diferencias ($p \leq 0.01$). el valor significativamente superior osciló entre 0.26 y 0.25 % señalados en las dos primeras edades (Tabla 7). Para el Ca, el incremento fue con la edad de la planta, las edades 60, 75 y 90 días no mostraron diferencias significativas, algo similar ocurrió entre 45 y 60.

El menor porcentaje de celulosa se obtuvo a los 30 días, aunque no se mostraron diferencias entre 45 y 60 días, algo similar ocurrió entre 75 y 90. La hemicelulosa nuevamente presentó concentraciones que aumentaban y disminuían con la edad, el valor más bajo ($p \leq 0.01$) se registró entre 30 y 45 días (Tabla 7).

Al establecer la relación funcional entre la edad y la composición química en el período poco lluvioso, se apreció que las variables FDN, FDA, LDA, Hemicelulosa, DMS, DMO y P, se ajustaron a ecuaciones de regresión cuadrática, en todos los casos excepto para la hemicelulosa ($R^2=0.69$), los coeficientes de determinación fueron altos, con errores estándar bajos (Tabla 8). Las variables PB, Celulosa y Ca, se ajustaron a ecuaciones de regresión cúbica. Para estos casos los coeficientes fueron superiores a 0.92, con errores estándar bajos y significación alta.

DISCUSIÓN

El incremento del rendimiento con la edad de rebrote en el período lluvioso (Tabla 3) se puede atribuir entre otros factores, al aumento del proceso fotosintético y la síntesis de metabolitos necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que trae consigo acumulación de materia seca (Del Pozo *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2010). Otro estudio en el trópico reflejó rendimientos superiores a los notificados en este trabajo, estos autores reportaron valores superiores a las siete toneladas a los 56 días de rebrote, lo que sin duda estuvo influenciado por las condiciones climáticas (Nguku *et al.*, 2016). Sin embargo, Reyes-Pérez *et al.* (2018), señaló

valores inferiores de rendimiento ($1.18 \text{ t MS ha}^{-1}$) al estudiar la *Brachiaria decumbens* a los 63 días de rebrote en condiciones climáticas del oriente de Cuba. Esta región se caracteriza por altas temperaturas, precipitaciones no superiores a los 1,000 mm, suelos erosionados y en proceso de degradación. Se plantea que cualquier variación que exista en los procesos fisiológicos, es una respuesta al régimen térmico, precipitaciones y distribución, factores que influyen directamente en la producción de materia seca y sus componentes, aunque es preciso no obviar aspectos que están incluidos en el manejo de los pastos como la edad de rebrote, frecuencia de corte, altura de corte y fertilización, entre otros (Méndez *et al.*, 2018).

En el período lluvioso el porcentaje de hojas disminuyó y el de los tallos aumentó (Tabla 3), mientras que en el poco lluvioso (Tabla 3) la proporción de hojas hasta los 105 días superó la de los tallos. Estudios similares en especies de *Brachiaria humidicola*, *B. decumbens* y *B. brizantha*, notificaron relaciones hoja/tallos a los 60 días de 0.85; 2.24 y 7.34, respectivamente, lo que reafirmó la capacidad que tienen estas especies de producir mayor cantidad de hojas con respecto a los tallos bajo determinadas condiciones climáticas (Espínola y Paniagua, 2010). En Cuba, en el período lluvioso los días con radiación e intensidad son mayores, con promedios de $482 \text{ cal cm}^2 \text{ día}^{-1}$, respecto al poco lluvioso ($360 \text{ cal cm}^2 \text{ día}^{-1}$), este último se describe por días con nubosidad y radiación solar difusa (Ledea, 2016), por lo que las plantas responden a estos estímulos de forma tal, en lluvias, alargan el tallo y pierden hojas, característico de crecimiento acelerado y rápida maduración de los tejidos, mientras en las pocas lluvias, es necesario para captar la energía difusa, ampliar las hojas (largo y ancho) y conservar la mayor cantidad de las mismas, ya que el crecimiento se hace más lento por la baja disponibilidad de carbohidratos osmóticamente activos para la síntesis de carbohidratos solubles y estructurales (Fortes *et al.*, 2016; Arias *et al.*, 2019), este mecanismo tiene una repercusión directa en cuanto a la calidad del forraje, donde en las primeras semanas de rebrote según Ortega *et al.* (2015), existe una redistribución de nutrientes en función de las demandas del estado fenológico de la planta, donde la principal inversión es en crecimiento y desarrollo.

Por otra parte, los mecanismos morfológicos condicionados por las estaciones climáticas determinan la efectividad de los sistemas de manejo cuando se trabaja con cortes sucesivos para obtener doseles de calidad. Así, Njarui *et al.* (2016) utilizaron la fertilización química para minimizar los efectos antes mencionados. Estos autores fertilizaron ocho variedades de *Brachiaria decumbens* con Nitrato de amonio y calcio; y Triple fosfato solo en temporada de lluvias, alcanzando producciones de MS que oscilaron entre 4.3 y 7.2 t MS ha^{-1} (Katumani) y 1.7 y 5.6 t MS ha^{-1} (Ithoukwe), aunque estos rendimientos superan los obtenidos en este estudio, dichos autores refieren los valores señalados como bajos en comparación con resultados en otras regiones donde se alcanzaron 16 t MS ha^{-1} (Tailandia), destacando como predisposición para la disminución de la productividad, la baja disponibilidad de

agua a partir de las precipitaciones y la poca retención de humedad en el suelo.

Los resultados y elementos antes expuestos permiten establecer que los cambios en la composición morfológica están condicionados por las condiciones edáficas y climáticas, las cuales pueden incrementar o disminuir el rendimiento, crecimiento de las hojas y tallos, así como variar sus proporciones, según la edad de rebrote (Reyes-Pérez *et al.*, 2018). Esta última determina la distribución de materia seca en los componentes morfológicos. La proporción de hojas en el forraje cosechado disminuye al aumentar el intervalo entre cosechas, debido al mayor crecimiento del tallo, cuando las condiciones ambientales son favorables para el crecimiento de las plantas tal como sucede en la época de lluvias. De ahí que el manejo de la defoliación de una pradera influye en la velocidad de crecimiento, producción, composición botánica, calidad y su persistencia (Nantes *et al.*, 2013). Lo que indica que es importante considerar no solo el rendimiento del forraje, sino también la proporción de hojas en relación con los tallos para considerar las producciones por unidad de superficie con calidad, lo que repercute de forma directa en la calidad del alimento y en la producción a la que está destinado el animal, ya sea leche o carne.

La relación funcional establecida entre la edad y los indicadores del rendimiento (rendimiento de materia seca, porcentajes de hojas y tallos), indicó ajustes de ecuaciones cuadráticas entre estas variables en los dos períodos estudiados (Tabla 3). Estudios en Cuba informaron ecuaciones de regresión cuadráticas y cúbicas para la especie *Brachiaria híbrida* (Ramírez *et al.*, 2010). Este autor notificó altos coeficientes de determinación y bajos errores estándar al establecer la relación entre la edad e indicadores del rendimiento, argumentando que esos elementos indican la alta dependencia de las variables morfológicas respecto a la edad. Rodríguez *et al.* (2013), notificaron resultados similares en especies de gramíneas tropicales, donde encontraron altos coeficientes de regresión y bajos errores estándar, lo que le confirió al modelo mayor precisión. Estos estudios informaron que la utilización de estos modelos puede constituir una solución al problema de estimar la producción de biomasa, a partir de los principales factores que intervienen en su desarrollo, lo que contribuye a establecer estrategias eficientes de manejo para su uso en la producción de leche y carne.

Al analizar la composición química, se pudo observar en los dos períodos (lluvioso y poco lluvioso) la disminución del porcentaje de proteína y el aumento de la fracción fibrosa al incrementar la edad de rebrote (Tablas 4 y 6). Los valores obtenidos se corresponden con los señalados por López García *et al.* (2017) y Reyes-Pérez *et al.* (2018) en *Brachiaria brizantha* y *Andropogon gayanus*. Estas respuestas químicas se justifican a partir de la relación inversamente proporcional que existe entre la MS y la proteína, esta fue descrita por Juárez y Bolaños (2007), y se manifiesta en todas las pasturas tropicales inherentemente de considerarse o no la edad de corte o rebrote de la planta.

Tabla 4. Ecuaciones de regresión entre la edad de rebrote e indicadores agronómicos en *Brachiaria decumbens* en dos periodos climáticos.

Table 4. Regression equations between regrowth age and agronomic indicators in *Brachiaria decumbens* at two climatic periods.

Período lluvioso			
	EE±	R ²	P
Rendimiento=-5.30+0.23(±0.01) E-0.001(±0.0001) E ²	0.31	0.93	0.001
Porcentaje de Hojas=120.2-1.97(±0.03) E+0.01(±0.001) E ²	2.37	0.98	0.0001
Porcentaje de tallos=-2.49+1.30(±0.02) E-0.007(±0.002) E ²	1.89	0.97	0.001
Período poco lluvioso			
Rendimiento=-2.25+0.10(±0.002) E-0.0007(±0.0001) E ²	0.17	0.89	0.001
Porcentaje de Hojas=86.24-0.46(±0.02) E+0.001(±0.0002) E ²	1.21	0.98	0.001
Porcentaje de tallos=25.43+0.03(±0.002) E+0.0006(±0.0001) E ²	0.25	0.99	0.0001

Tabla 5. Composición química y digestibilidad ruminal in situ de la *Brachiaria decumbens* en diferentes edades de rebrote en el período lluvioso.

Table 5. Chemical composition and in situ ruminal digestibility of *Brachiaria decumbens* at different regrowth ages during rainy season.

Variables químicas	Edad (días)						EE±	P
	30	45	60	75	90	105		
PB (%)	11.82 ^a	6.24 ^b	5.74 ^c	5.43 ^c	5.62 ^c	3.82 ^d	0.52	0.01
FDN (%)	60.52 ^e	71.64 ^d	72.06 ^c	73.46 ^b	72.90 ^b	76.43 ^a	1.04	0.01
FDA %	31.93 ^e	39.02 ^d	41.13 ^c	41.68 ^c	43.20 ^b	45.22 ^a	0.88	0.01
LDA (%)	3.69 ^e	4.33 ^d	4.68 ^c	4.56 ^c	5.06 ^b	5.45 ^a	0.11	0.01
Celulosa (%)	28.24 ^e	34.69 ^d	36.45 ^c	37.12 ^{bc}	38.15 ^b	39.77 ^a	0.77	0.01
Hemicelulosa (%)	28.59 ^d	32.63 ^a	30.93 ^c	31.78 ^b	29.70 ^d	31.21 ^c	0.28	0.01
DMS (%)	57.09 ^a	53.57 ^b	52.31 ^c	50.09 ^d	47.13 ^e	45.83 ^f	0.79	0.001
DMO (%)	61.10 ^a	57.58 ^b	55.42 ^c	54.11 ^c	51.24 ^d	50.67 ^d	0.75	0.001
P (%)	0.32 ^a	0.19 ^b	0.14 ^c	0.15 ^{cd}	0.16 ^{de}	0.17 ^e	0.01	0.01
Ca (%)	0.26 ^d	0.28 ^d	0.36 ^c	0.40 ^b	0.50 ^a	0.50 ^a	0.02	0.01

Letras desiguales en una misma fila difieren según Keuls (1952).

Tabla 6. Ecuaciones de regresión entre la edad de rebrote e indicadores de la composición química y digestibilidad ruminal in situ en la *Brachiaria decumbens* en el período lluvioso.

Table 6. Regression equations between regrowth age, and chemical composition and in situ ruminal digestibility indicators in *Brachiaria decumbens* during rainy season.

Ecuación	EE±	R ²	P
PB=40.36-1,49(±0.05) E+ 0,02(±0.001) E ² -0,0001(±0.00001) E ³	0.33	0.98	0.001
FDN=6,06+2,85(±0.91) E-0,002(±0.0001) E ² +0,0001(±0.00001) E ³	0.84	0.98	0.001
FAD=-0,60+1,65(±0.07) E-0,02(±0.001) E ² +0,0001(±0.00001) E ³	0.99	0.99	0.001
LAD=0,35+0,17(±0.03) E-0,002(±0.0001) E ² +0,00001(±0.000001) E ³	0.14	0.94	0.001
Celulosa=-0,96+1,47(±0.06) E-0,01(±0.003) E ² +0,0001(±0.00001) E ³	0.33	0.99	0.0001
Hemicelulosa=6,66+1,19(±0.04) E-0,02(±0.003) E ² +0,0001(±0.00001) E ³	0.77	0.72	0.01
DMS=62,35-0,19(±0.01) E+ 0,0003(±0.00001) E ²	0.48	0.98	0.001
DMO=68,03-0,26(±0.003) E 0,0009(±0.00002) E ²	0.47	0.98	0.001
P=0,93-0,03(±0.002) E+ 0,0003(±0.0001) E ² -0,0001(±0.00001) E ³	0.01	0.94	0.001
Ca=0,12+ 0,003(±0.0001) E-0,00002(±0.00001) E ²	0.02	0.93	0.002

Los valores para FDN, FDA, LAD y Celulosa en función de la edad de rebrote fueron similares a los obtenidos por González *et al.* (2012), al estudiar pastos del género *Brachiaria*. Sin embargo, el comportamiento de estas mismas variables coincide con el descrito por Ledea *et al.* (2018) en tres variedades de *Cenchrus purpureus* en las condiciones del oriente de Cuba. Para la celulosa estos autores encontraron mayor concentración y variabilidad en la estación de lluvias, adjudicado principalmente a la prevalencia de altas temperaturas y mayor exposición a radiación solar que estimula la síntesis de homopolisacáridos por encima de los hetepolisacáridos, donde se encuentra la poliosa. En este sentido es de destacar que para que esta se sintetice es necesario la incorporación del grupo amino a la estructura química de la hemicelulosa, y que al persistir altas temperaturas no se logra, ya que el transporte del grupo funcional es mediante enzimas y estas, se desnaturalizan por las altas temperaturas, lo que puede explicar los resultados de esta investigación, ya que son condiciones que prevalecen en el oriente cubano.

Por otra parte, la FDA y FDN, agrupan carbohidratos estructurales y minerales en su denominación, el ácido detergente concentra lignina, celulosa y sílice, mientras que el neutro detergente, además de estos constituyentes incluye también la hemicelulosa. Así, en la tabla 6, se puede constatar que el patrón de la FDA es similar al mostrado por la celulosa y el de la FDN similar al de la hemicelulosa. Esto se debe según Ledea (2016) a que, la superioridad cuantitativa de un carbohidrato estructural sobre otro sería la respuesta o comportamiento que asumiría el resultado analítico. Este mismo autor notificó resultados para el período lluvioso, donde mostró coeficientes de correlación entre la FDA y celulosa de 0.99, con contribuciones de modificación de la celulosa sobre la FDA de 98 %, mientras que la FDN se correlacionó mayoritariamente con la lignina (0.83), denotando en su estudio que en la época de lluvias es la lignina dentro de la FDN quien mayor implicación tiene en su variabilidad, en el presente estudio no se desarrollaron matrices, pero es posible que parte de los fenómenos mencionados se pusieran de manifiesto con la particularidad de la especie en estudio.

La DMS y DMO disminuyeron en la medida que avanzó la edad de rebrote en los dos períodos estudiados. La disminución de la digestibilidad de la materia seca y orgánica con el aumento de la edad está influenciada relativamente por el crecimiento de la planta (madurez), es bien conocido el incremento de la fracción fibrosa con el incremento de la edad, sin embargo, afecta de forma diferente al rumiante. En este sentido Barrera *et al.* (2015), relacionaron la progresiva depresión de la degradabilidad a las interrelaciones que se establecen entre los carbohidratos estructurales y compuestos fenólicos y no a la presencia de los mismos en la pared celular, mientras que en otro estudio de evaluación de degradabilidad de hojas, tallos y planta íntegra Ledea-Rodríguez *et al.* (2018) señalaron que la reducción de la degradabilidad en función con el aumento de la edad se vinculaba con la salud del ambiente ruminal, ya que la expresión de la degradación de este componente está directamente relacionado con

la masa microbiana que coloniza el bolo alimenticio, en el presente estudio la DMO no se afectó drásticamente, sugiriendo que está disponible a nivel de la estructura celular y la microflora microbiana puede hacer uso de la misma sin prolongados tiempos de retención, mientras que para la DMS, los resultados en este estudio se relacionan con el patrón de degradación ruminal para esta fracción.

Resultados superiores al 50 % de digestibilidad para estas especies fueron obtenidos por Barrera *et al.* (2015) y Mojica *et al.* (2017). Mientras que Cruz *et al.* (2017) en *Brachiaria humidicola*, con frecuencias de corte cada 21 y 28 días encontraron resultados de 54-60 %, valores estos por encima a los alcanzados en el presente estudio. Sin embargo, no deben catalogarse como reducidas las degradabilidades tanto de la MS como de la MO, ya que ambas superaron el 50% de degradación, constituyendo este valor, como límite superior permisible para gramíneas tropicales por las relaciones e interrelaciones que se establecen entre los constituyentes de la pared celular, y no por la mera cuantificación de un carbohidrato estructural.

En el contenido de fósforo y calcio (Tabla 4 y 6), se obtuvieron variabilidades para cada mineral. En el caso del fósforo su concentración disminuyó en función de la edad, comportamiento considerado como normal, ya que este es un mineral móvil y tiene su mayor representatividad en las primeras edades donde el crecimiento es activo, debido a su participación en el control de los procesos metabólicos, activación de enzimas y mediador de los procesos energéticos de la planta, sin embargo, las concentraciones observadas en la tabla 4 y 6, a partir de los 45 días son inferiores a 0.2 %, valor referido por Domínguez *et al.* (2012) necesario para que la planta cumpla con sus funciones básicas de crecimiento y desarrollo. Las condiciones edáficas pudieron intervenir de forma negativa en la absorción de fósforo, ya que según Canesin *et al.* (2012) en rangos de acidez entre 5.5-6.2 se puede afectar el proceso de absorción de minerales por parte del sistema radical de la planta al presentarse como $(PO_4)_2Ca_3$, y de esta forma no ser asimilado, ya que según las características químicas del suelo donde se cultivó el pasto el valor de pH fue de 6.5 (Tabla 1).

Arias y Hernández (2002) señalaron valores entre 0,16-0,23 % para P y 0,22 y 0,48 % en el Ca en *Brachiaria humidicola*, similares a los obtenidos en este trabajo, pero sugirieron que valores inferiores a 0,25 % son críticos para animales en pastoreo. Según Balseca *et al.* (2015) el comportamiento de los minerales en los pastos es atribuible al efecto de los factores del clima específicamente de las lluvias y las temperaturas, que propician que estos elementos necesarios para el crecimiento de las plantas se encuentren en la disolución del suelo, y las raíces tengan relativa facilidad para su absorción, patrón de respuesta que fue confirmado por Jarma *et al.* (2012) en *Brachiaria humidicola* y Merlo-Maydana *et al.* (2017) en *Brachiaria brizantha*. Sin embargo, Valbuena *et al.* (2016) y López García *et al.* (2017) en *Brachiaria brizantha* y Patiño *et al.* (2018) en *Megathyrus maximus* encontraron que la ceniza tiende a decaer con el aumento de la edad, debido

Tabla 7. Composición química y digestibilidad ruminal in situ de la *Brachiaria decumbens* en diferentes edades de rebrote en el período poco lluvioso.

Table 7. Chemical composition and in situ ruminal digestibility of *Brachiaria decumbens* at different regrowth ages during dry season.

Variables químicas	Edad (días)						EE±	P
	30	45	60	75	90	105		
PB (%)	12.28 ^a	8.29 ^b	6.17 ^c	6.20 ^c	5.31 ^d	4.24 ^e	0.54	0.001
FDN (%)	62.99 ^e	64.35 ^d	67.97 ^c	69.41 ^b	69.69 ^b	75.96 ^a	0.87	0.002
FDA %	32.80 ^f	33.76 ^e	34.32 ^d	36.36 ^c	37.40 ^b	42.43 ^a	0.66	0.01
Lignina (%)	3.16 ^e	3.29 ^e	3.73 ^d	4.06 ^c	4.49 ^b	5.01 ^a	0.13	0.001
Celulosa (%)	29.64 ^d	30.47 ^c	30.59 ^c	32.59 ^b	32.91 ^b	37.41 ^a	0.53	0.01
Hemicelulosa (%)	30.18 ^d	30.58 ^d	33.65 ^a	33.05 ^b	32.28 ^c	33.53 ^a	0.28	0.01
DMS (%)	61.13 ^a	59.07 ^b	54.39 ^c	51.64 ^d	48.37 ^e	46.33 ^f	1.11	0.001
DMO (%)	64.51 ^a	62.84 ^b	59.57 ^c	55.73 ^d	52.10 ^e	50.27 ^f	1.09	0.001
P (%)	0.26 ^a	0.25 ^a	0.18 ^b	0.17 ^{bc}	0.16 ^c	0.16 ^c	0.01	0.01
Ca (%)	0.30 ^d	0.36 ^c	0.38 ^{bc}	0.40 ^b	0.40 ^b	0.46 ^a	0.01	0.01

Letras desiguales en una misma fila difieren según Keuls (1952).

Tabla 8. Ecuaciones de regresión entre la edad de rebrote, y los indicadores de la composición química y digestibilidad ruminal in situ en la *Brachiaria decumbens* en el período poco lluvioso.

Table 8. Regression equations between regrowth age, and chemical composition and in situ ruminal digestibility indicators in *Brachiaria decumbens* during dry season.

Ecuación	EE±	R ²	P
PB =31,72-0,96(±0,05) E+0,012(±0,001) E ² -0,0005(±0,00004) E ³	0.23	0.99	0.001
FDN =61,26+ 0,03(±0,005) E+0,001(±0,0004) E ²	1.19	0.93	0.001
FAD =35,21-0,12(±0,033) E+0,001(±0,0002) E ²	0.29	0.96	0.001
LAD =2,86+ 0,004(±0,0004) E+0,0001(±0,00003) E ²	0.09	0.98	0.001
Celulosa =22,88+ 0,38(±0,11) E-0,006(±0,001) E ² +0,00004(±0,00001) E ³	0.46	0.97	0.001
Hemicelulosa =26,05+ 0,15(±0,04) E-0,001(±0,0002) E ²	0.81	0.69	0.01
DMS =69,26-0,26(±0,02) E+ 0,0004(±0,0002) E ²	0.56	0.99	0.001
DMO =70.58-0,17(±0,03) E-0,0001(±0,00002) E ²	0.69	0.98	0.001
P =0,41-0,005(±0,001) E+ 0,0003(±0,0001) E ²	0.02	0.83	0.002
Ca =-0,05+ 0,02(±0,003) E-0,0002(±0,0001) E ² +0,00001(0,000003) E ³	0.01	0.92	0.0002

a que las plantas requieren diferentes cuantías de minerales dependiendo de su estado fenológico.

De forma general los modelos que describieron las diferentes variables evaluadas se ajustaron a ecuaciones de regresiones cuadráticas y cúbicas, con altos coeficientes. Los trabajos de Rodríguez *et al.* (2013), reportaron modelos cúbicos y cuadráticos para describir el rendimiento y la calidad de diferentes especies de pastos tropicales. Así, Uvidía *et al.* (2015 y 2018), describieron el crecimiento en función de la edad para diferentes variables de calidad en la amazonia ecuatoriana, reafirmando la importancia de los modelos para relacionar estas variables, lo que le confiere importancia a este trabajo.

Otros resultados notificaron el empleo de modelos para explicar la relación entre la edad y la composición química. Ramírez *et al.* (2016), establecieron ecuaciones de regresiones múltiples en la especie *Cenchrus purpureus*, estos autores encontraron altos coeficientes de regresión y bajos errores estándar, lo que le confirió al modelo mayor precisión

(Guerra *et al.*, 2003). Otros trabajos en diferentes especies de pastos tropicales reflejaron modelos de regresión para relacionar la edad con la composición de géneros como el *Cenchrus* y *Brachiaria* (Ramírez *et al.*, 2010; Ordaz *et al.*, 2018) justificando los resultados de esta investigación.

CONCLUSIONES

La composición química, digestibilidad y rendimiento de *Brachiaria decumbens* fue influenciada de forma directa por las diferentes edades de rebrote, al aumentar la producción de la planta y disminuir su calidad. Se obtuvieron ecuaciones de regresión cuadráticas y cúbicas que establecieron una estrecha relación de la edad con los indicadores del rendimiento, la composición química y digestibilidad.

REFERENCIAS

- Argel, P.J., Miles, J.W., Guiot, J.D. & Lascano, C.E. 2006. Cultivar Mulato (*Brachiaria híbrido* CIAT 36061) Gramínea de alta producción y calidad forrajera para los trópicos. Disponible

- en: ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/CV%20Mulato.pdf.
- Arias, A. & Hernández, H. 2002. Composición química del pasto aguja (*Brachiaria humidicola*) sometida a pastoreo en una finca del Municipio Guanare Estado Portuguesa. Revista Científica. 2: 562-565.
- Arias, R.C., Reyes, J.J.; Ledea, J.L.; Benítez, D.G.; Ray, J.V. & Hernández, L.G. 2019. Respuesta agroproductiva de nuevas variedades de *Cenchrus purpureus*. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 22: 79-86.
- Avilés, R. R., Delgadillo, S. J. A., Flores, J. A., Flores, N. M.J., Vargas, C. A. A., Barrón, B. O., Sánchez, H. A., & Hernández, H. H. 2021. Efecto del periodo seco en cabras bajo condiciones de pastoreo, en el volumen y cantidad de compuestos lácteos subsecuente. Biotecnia. 23(1): 86-91.
- Balseca D. G., Cienfuegos E. G., López H. B., Guevara H. P., & Martínez J. C. 2015. Nutritional value of Brachiarias and forage legumes in the humid tropics of Ecuador. Ciencia e Investigación Agraria. 42: 57-63.
- Barrera, A.E., Avellaneda, J.H., Tapia, E.O., Peña, M.M., Molina, C.A. & Casanova, L.M. 2015. Composición química y degradación de cuatro especies de *Pennisetum sp.* Ciencias Agrarias. 8(2): 13-27.
- Bartlett, M. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Society of London. Ser. A. 160(2): 268-282.
- Canesin, R.C., Fiorentini, G. & Berchielli, T.T. 2012. Innovations and challenges in food evaluation in ruminant nutrition. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 13(4): 938-953.
- Cruz, A., Hernández, A., Chay, A.J., Mendoza, S.I., Ramírez, S., Rojas, A.R. & Ventura, J. 2017. Componentes del rendimiento y valor nutritivo de *Brachiaria humidicola* cv Chetumal a diferentes estrategias de pastoreo. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8(3): 599-610.
- Cruz, M., Pereda, J. & Muñoz, D. 2015. Evaluación económica-productiva de un sistema de ceba semi estabulado con pastoreo de *Brachiaria brizantha* cv Marandú en la provincia de Camagüey. Ecosistema Ganadero. 2(1y 2): 17-26.
- Del Pozo, P.P., Herrera, R.S., García, M., Cruz, A.M. & Romero, A. 2001. Análisis del crecimiento y desarrollo del pasto estrella con y sin adición de fertilizante nitrogenado. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 35(1): 51-58.
- Domínguez Gómez, T.G., Ramírez Lozano, R.G., Estrada Castillón, A.E., Scott Morales, L.M., González Rodríguez, H. & Alvarado, M.D.S. 2012. Importancia nutricional en plantas forrajeras del matorral espinoso tamaulipeco. Ciencia UANL. 15(59): 77-93
- Espinola, C.J. & Paniagua, P.L. 2010. Determinación de rendimiento y calidad forrajera de especies del género *Brachiaria*, en un suelo derivado de granito. Investigación Agraria. 12(1):5-10.
- FAO. 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. DOI: <http://www.fao.org/publications>
- Fernández, D., López, M., Pérez, Y., Arzola, J. & De la Fe, G. 2015. Evaluación del comportamiento en corte de cultivares de los géneros *Megathyrus* y *Brachiarias* introducidas en suelo Ferralítico rojo. Ecosistema Ganadero. 2(1 y 2): 27-34.
- Fernández, J.L., Benítez, D.E., Gómez, I., de Souza, A. & Espinosa, R. 2004. Rendimiento de materia seca y proteína bruta del pasto *Panicum maximum* vc. Likoni en un suelo vertisuelo de la provincia Granma. Revista Cubana de Ciencias Agrícolas. 38(4): 417-421.
- Fortes, D., Valenciaga, D., García, C.R., García, M., Cruz, A.M. & Romero, A. 2016. Evaluation of three varieties of *Megathyrus maximus* in the dry period. Cuban Journal of Agricultural Science. 50(1): 131-137.
- Goering, H.K. & Van-Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis. Agricultural Handbook, US No 379. USDA, WA, USA.
- González Arcia, M., Valles de la Mora, B., Alonso Díaz, M.Á., Castillo Gallegos, E., Ocaña Zavaleta, E. & Jarillo Rodríguez, J. 2012. Effect of grazing *Cratylia argentea* associated with *Brachiaria brizantha* Toledo on quality pasture and weight gain in holstein x zebu heifers. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 15 (SUP 2): 1-11.
- Guerra, C., Cabrera, A. & Fernández, L. 2003. Criterios para la selección de modelos estadísticos en la investigación científica. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 37(1): 3-10.
- Herrera, R.S. 2006. Pastos tropicales, contribución a la Fisiología, establecimiento, rendimiento de biomasa, producción de biomasa, producción de semillas y reciclaje de nutrientes, Ed. EDICA. ICA, La Habana. p. 37.
- Jarma, A., Maza, L., Pineda, A. & Hernández, J. 2012. Aspectos fisiológicos y bromatológicos de *Brachiaria humidicola*. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. 7(1): 88-99.
- Juárez, J. & Bolaños, E.D. 2007. Las curvas de dilución de la proteína como alternativa para la evaluación de pastos tropicales. Universidad y Ciencia. 23(1): 81-90.
- Keuls, M. 1952. "The use of the 'studentized range' in connection with an analysis of variance". Euphytica, 1(2): 112-122.
- Latimer, G.W. 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International, Rockville, MD, USA. <http://www.directtextbook.com/isbn/9780935584875>.
- Ledea, J.J. 2016. Caracterización de la composición químico-nutritiva de nuevas variedades de *Cenchrus purpureus* en condiciones edafoclimáticas del Valle del Cauto. (Maestro en Ciencias). Universidad de Granma. <https://www.udg.co.cu/index.php/es/investigacion/centros-de-estudio/ceqa>
- Ledea-Rodríguez, J.L., Ray-Ramírez, J.V. & Reyes-Pérez, J.J. 2018. Ruminal degradability of organic matter of varieties of drought tolerant *Cenchrus purpureus*. Agronomía Mesoamericana. 29(2): 375-387.
- López García, F.A.; Alberto Miranda, J.A. & Calero, W.A. 2017. Producción y calidad de forraje con enmiendas orgánicas en pastura (*Brachiaria brizantha*), en la Costa Caribe Sur de Nicaragua. Revista Universitaria del Caribe. 18(1): 83-90.
- Massey, F.J. 1951. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. Journal of the American Statistical Association. 68-78.
- Méndez, Y., Suárez, F.O., Verdecia, D.M., Herrera, R.S., Labrada, J.A., Murillo, B. & Ramírez, J. L. 2018. Caracterización bromatológica del Follaje de *Moringa oleifera* en diferentes estadios de desarrollo. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 52(3):337-346.
- Merlo-Maydana, F.E., Ramírez-Avilés, L., Ayala-Burgos, A.J. & Ku-Vera, J.C. 2017. Efecto de la edad de corte y la época del año sobre el rendimiento y calidad de *Brachiaria brizantha*. Journal of the Selva Andina Animal Science. 4(2): 116-127.
- Mojica, J.E., Castro, E., Carulla, J. & Lascano, C.E. 2017. Efecto de la edad de rebrote sobre el perfil de ácidos grasos en gramíneas tropicales. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 18(2): 217-232.

- Nantes, N.N., Euclides, V.P.B., Montagner, D.B., Lempp, B., Barbosa, R.A. & Gois, P.O.D. 2013. Desempenho animal e características de pastos de capim-piatã submetidos a diferentes intensidades de pastejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 48(1):114-121.
- Nguku, S.A., Njarui, D.N., Musimba, N.K., Amwata, D. & Kaindi, E.M. 2016. Primary production variables of *Brachiaria* grass cultivars in kenya drylands. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 19(1): 29 - 39. ISSN: 1870-0462.
- Njarui, D.M.G., Gatheru, M., Ghimire, S.R. & Mureithi, J.G. 2016. Effects of seasons and cutting intervals on productivity and nutritive value of *Brachiaria* grass cultivars in semi-arid eastern Kenya (DMG Njarui, EM Gichangi, SR Ghimire, RW Muinga, eds.). In *Climate smart Brachiaria grasses for improving livestock production in East Africa: Kenya Experience. Proceedings of a workshop* (pp. 46-61).
- Navarro, V. C. L., Ibarra, V. L. M., Diosdado, R. J. D., Madriz, E. A. L., Cardona, L. M. A., Varela, H. J. J., Silva, S. J., Arvizu, M. S. M. & Padilla, F. J. J. 2021. Frecuencia, distribución territorial y resistencia a los antimicrobianos de *Salmonella* spp. aislada de heces de ganado bovino de la región Altos Sur en el estado de Jalisco, México. *Biocencia*. 23 (3): 5-13.
- Official Methods of Analysis ff AOAC International - 20th Edition. (2016). BOOK by AOAC International, 2016. Editor: Dr. George W. Latimer, Jr.
- Ørskov, E.R. & McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*. 92:499-503. doi:10.1017/S0021859600063048.
- Ortega, C., Lemus, C., Bugarín, J., Santiago, A., Ramos, A., Grageola, O. & Bonilla, J. 2015. Características agronómicas, composición bromatológica, digestibilidad y consumo animal en cuatro especies de pastos de los géneros *Brachiaria* y *Panicum*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 18(3): 291-301.
- Patiño, R.M., Gómez, R. & Navarro, O.A. 2018. Calidad nutricional de Mombasa y Tanzania (*Megathyrus maximus*, Jacq.) manejados a diferentes frecuencias y alturas de corte en Sucre, Colombia. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 13(1): 17-30.
- Ramírez, J.L., Herrera, R.S., Leonard, I., Verdecia, D. & Álvarez, Y. 2012. Rendimiento y calidad de la *Brachiaria decumbens* en suelo fluvisol del Valle del Cauto, Cuba. *REDVET* 13(4): 1-11.
- Ramírez, J.L., Herrera, R.S., Leonard, I., Verdecia, D., Álvarez, Y., Arceo, Y. & Uvidia, H. 2016. "Influencia del clima en la calidad de dos variedades de *Megathyrus maximus* en ecosistemas frágiles y degradados de Cuba". In: IV Convención Internacional Agrodesarrollo, Matanzas, Cuba: Estación Experimental 'Indio Hatuey'
- Ramírez, R.O., Hernández, G.A., Carneiro, S.S., Pérez, P.J., de Souza J.S.J. Castro, R.R. & Enríquez Q.J.F. 2010. Características morfogénicas y su influencia en el Rendimiento del pasto mombaza, cosechado a diferentes Intervalos de corte. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 303 - 311.
- Reyes-Pérez, J.J., Méndez-Martínez, Y., Verdecia, D.M., Luna-Murillo, R.A., Hernández Montiel, L.G. & Herrera, R.S. 2018. Componentes del rendimiento y la composición bromatológica de tres variedades de *Brachiaria* en la zona El Emplame, Ecuador. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 52(4): 435-445.
- Rodríguez, L., Lardue, R., Martínez, R.O. Torres, V., Herrera, M., Medina, Y. & Noda, A. 2013. Modelación de la dinámica de acumulación de biomasa en *Pennisetum purpureum* vc. king grass en el occidente de Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 47(2): 119-124.
- Rojas-García, A.R., Torres-Salado, N., Maldonado-Peralta, M.D.L.Á., Sánchez-Santillán, P., García-Balbuena, A., Mendoza-Pedroza, S.I. & Hernández-Garay, A. 2018. Curva de crecimiento y calidad del pasto cobra (*Brachiaria* híbrido br02/1794) a dos intensidades de corte. *Agroproductividad*. 11(5): 34-38.
- SPSS. 2012. Software for Window, release 21.0, INC., Chicago, IL USA.
- Uvidia, H., Ramírez, J., Vargas, J., Leonard, I. & Sucoshañay, J. 2015. Rendimiento y calidad del *Pennisetum purpureum* vc Maralfalfa en la Amazonía ecuatoriana. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 16 (6): 1-5.
- Uvidia-Cabadina, H.A., Ramirez-De-La-Rivera, J.L., De Decker, M., Torres, B., Samaniego-Guzmán, E.O., Ortega-Tenezaca, D. B. & Uvidia-Armijo, L.A. 2018. Influence of age and climate in the production of *Cenchrus purpureus* in the ecuadorian amazon region. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 21: 95-100.
- Valbuena, N., Tejos, R. & Terán, Y. 2016. Efecto de fertilización nitrogenada e intervalo entre cortes sobre contenido de proteína y fibra en *Brachiaria brizantha* cv. Toledo en portuguesa. *Revista Unellez Ciencia y Tecnología*. 34(1): 25-32.

Extracción, caracterización y actividad antioxidante de lignina de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*)

Extraction, characterization and antioxidant activity of lignin from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and pecan nut shell (*Carya illinoensis*)

Espinoza-Acosta JL¹, Montaña-Leyva B^{2*}, Valencia-Rivera DE³, Ledesma-Osuna AI², Vega-Ríos A⁴

¹ Universidad Estatal de Sonora, Blvd. Manlio Fabio Beltrones 810, Col. Bugambillas, Navjoa, Sonora, México.

² Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora (UNISON), Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, México.

³ Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Sonora (UNISON). Ave. Universidad e Irigoyen. Caborca, Sonora, México.

⁴ Departamento de Ingeniería y Química de Materiales. Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMA). Miguel de Cervantes Saavedra No. 120, Complejo Industrial Chihuahua, Chihuahua, México.

RESUMEN

En este trabajo se investigó el potencial de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*) como fuente de lignina. La extracción de la lignina se realizó aplicando un procedimiento organosolv y fue caracterizada por espectroscopía de infrarrojo, microscopía electrónica de barrido, y análisis termogravimétrico. La actividad antioxidante fue determinada a través de la estabilización de los radicales libres DPPH y ABTS. Los resultados mostraron mayor porcentaje de lignina y rendimiento de extracción en las cáscaras de nuez. El espectro infrarrojo reveló bandas típicas de los principales grupos funcionales; grupos -OH fenólicos, grupos metilo C-H₃ y metoxilo O-CH₃ los cuales forman parte del anillo aromático de la lignina. La lignina de lirio acuático (LLA) mostró alta resistencia a la degradación térmica esto la sitúa como componente interesante para el desarrollo de resinas fenólicas o retardantes de flama. La lignina extraída de las cáscaras de nuez pecanera (LCN) mostró un alto porcentaje de inhibición contra los radicales DPPH y ABTS cuando fue solubilizada en etanol, metanol y mezclas de etanol-metanol 50:50 v/v. La alta actividad antioxidante de la LCN indica que este tipo de lignina pueden tener aplicaciones en la industria de alimentos y farmacéutica.

Palabras clave: Lignina, lirio acuático, cáscara de nuez, actividad antioxidante

ABSTRACT

In this work, the potential of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and pecan nutshell (*Carya illinoensis*) as a source of lignin was investigated. The lignin extraction was carried out using an organosolv procedure and was characterized by infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and thermogravimetric analysis. The antioxidant activity was determined through the stabilization of the DPPH and ABTS free radicals. The results showed higher lignin content and extraction performance in pecan nutshells. The infrared

spectrum revealed typical bands of the main functional groups; phenolic -OH groups, C - H₃ methyl groups, and O-CH₃ methoxyl which are part of the lignin aromatic ring. The water hyacinth lignin (LLA) showed high resistance to thermal degradation which places it as an interesting component for the development of phenolic resins or flame retardants. The lignin extracted from pecan nutshell (LCN) showed a high percentage of inhibition against DPPH and ABTS radicals when solubilized in ethanol, methanol, and ethanol-methanol mixtures (50:50 v/v). The high antioxidant activity of LCN indicates that this type of lignin may have applications in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Lignin, water hyacinth, pecan nutshell, antioxidant activity

INTRODUCCIÓN

La lignina esta presente en varias regiones de la pared celular de las plantas y es considerada un heteropolímero aromático ramificado, aleatoriamente formado por unidades de fenilpropano. Recientemente, investigaciones relacionadas con la transformación química y biológica de residuos agrícolas en productos de alto valor están dirigiendo la atención a compuesto como la lignina (Ragauskas *et al.*, 2014). Esto se debe a que la conversión de residuos agrícolas en productos finales implica necesariamente la remoción de dicho compuesto. Por ejemplo, para obtener combustibles celulósicos, la separación de la lignina del resto de los componentes de la biomasa es un paso obligatorio. Comúnmente, la industria papelera y las biorrefinerías generan grandes cantidades de lignina como subproductos de sus procesos, pero estas son quemadas para producir energía de bajo costo (Zakzeski *et al.*, 2010). Numerosas investigaciones han propuesto el uso de estas ligninas en diversas aplicaciones, e.g., en resinas fenólicas sustituyendo el fenol químico por el fenol de la lignina (Ghorbani *et al.*, 2016), como un adhesivo natural para medicinas, alimentos y textiles (Mattinen *et al.*, 2018), como materia prima para la fabricación de fibras de carbono (Qu *et*

al., 2021) y como antioxidante de polímeros termoplásticos (Pouteau *et al.*, 2003).

Por otro lado, los materiales lignocelulósicos no convencionales como vainas, cáscaras, frutos secos o malezas están recibiendo mucha atención como fuente de polímeros lignocelulósicos. El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*), una maleza acuática invasora de lagos y ríos ha sido ampliamente explorada como materia prima para la elaboración de biocombustibles (Rezania *et al.*, 2017) ya que contiene una cantidad considerable de lignina (Lara-Serrano *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta el día de hoy no existen investigaciones sobre la extracción y caracterización de la lignina obtenida a partir de estas plantas.

Otro material lignocelulósico altamente abundante son las cáscaras de la nuez pecanera (*Carya illinoensis*) que se obtienen en grandes cantidades a partir del descascarado de nueces. El procesamiento de dichas nueces descarta del 40 al 50 % de su peso siendo la cáscara este desecho. Las cáscaras de nuez pecanera tienen poco valor económico y su eliminación es costosa. Sin embargo, recientemente se ha reportado que los extractos o infusiones alcohólicas a partir de la cáscara de nuez pecanera poseen actividad antioxidante y antibacteriana (Pinheiro do Prado *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2013). Algunas investigaciones han reportado la extracción de lignina a partir de cáscaras de frutos secos (Quesada-Medina *et al.*, 2010) mientras que la cáscara de nuez pecanera no se ha estudiado para este propósito. Generalmente la extracción de los compuestos fenólicos a partir de cáscaras de frutos secos se realiza utilizando alcoholes como solventes, no obstante, estos logran bajos rendimientos de extracción. En contraste, el uso de ácidos orgánicos (proceso organosolv) se ha aplicado ampliamente para remover lignina de varias biomásas lignocelulósicas con resultados favorables. El proceso organosolv tiene la capacidad de separar y obtener de forma individual celulosas, hemicelulosas y ligninas, además de que los ácidos orgánicos utilizados pueden recuperarse y reutilizarse. Las ligninas aisladas utilizando ácidos orgánicos (denominada lignina organosolv) tienen mayor pureza que las obtenidas mediante otros procesos químicos (Espinoza-Acosta *et al.*, 2014). Además, la lignina obtenida por el proceso organosolv es altamente soluble en varios solventes orgánicos. Su pureza, actividad antioxidante y alta capacidad de solubilizarse puede ser útil en aplicaciones como adhesivos, resinas fenólicas, antioxidantes y como protector UV de materiales termoplásticos. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue la extracción y caracterización de dos materias primas lignocelulósicas no convencionales como fuentes potenciales para la obtención de lignina con propiedades antioxidantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Las plantas de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) fueron colectadas en el río Mayo en Navojoa, Sonora, México (27°6'11"N y 110°33'50"O) mientras que las cáscaras de nuez (*Carya illinoensis*) fueron donadas por una productora de

nueces local. Para la eliminación de las impurezas las muestras fueron lavadas con agua destilada y se llevaron a sequedad a 60 °C por 24 horas. Las raíces de las plantas de lirio acuático fueron removidas para obtener solamente las hojas y los tallos. Tanto el lirio acuático como las cáscaras de nuez se trituraron en un molino de cuchillas (Fritsch Pulverisette, Alemania) y se pasaron a través de una malla de 2 mm. Las muestras molidas fueron colocadas en bolsas de polipropileno para su posterior análisis. Los reactivos y solventes utilizados para el desarrollo de este estudio fueron grado analítico (*i. e.*, J.T. Baker, FagaLab, Química Meyer y Sigma-Aldrich)

Composición de las materias primas

Las muestras molidas de lirio acuático y cáscaras de nuez pecanera se caracterizaron de acuerdo con los métodos estandarizados de la Asociación Técnica de la Industria del Papel y la Pulpa (TAPPI). Determinación de ceniza (TAPPI T 211 om-16), compuestos extraíbles (TAPPI T 204 cm-07) usando hexano-etanol (60:30 v/v) en lugar de benceno, lignina insoluble en ácido (TAPPI T 222 om-11), y se realizaron determinaciones del contenido de hemicelulosa y celulosa (Wise *et al.*, 1946).

Extracción de lignina

La extracción de la LCN y la LLA se realizó siguiendo la metodología organosolv reportada por Xu *et al.* (2006). Para extraer la lignina de manera separada el lirio y las cáscaras de nuez molidas fueron sometidos a hidrólisis con una mezcla de ácido acético (AC), ácido fórmico (AF) y agua destilada (AD) (AC/AF/AD 60:30:10 v/v/v relación 1:10 p/v) durante 4 horas. El diagrama general del proceso de extracción de la lignina se muestra en la Figura 1. El rendimiento de extracción de lignina se expresó en porcentaje del peso de la biomasa lignocelulósicas.

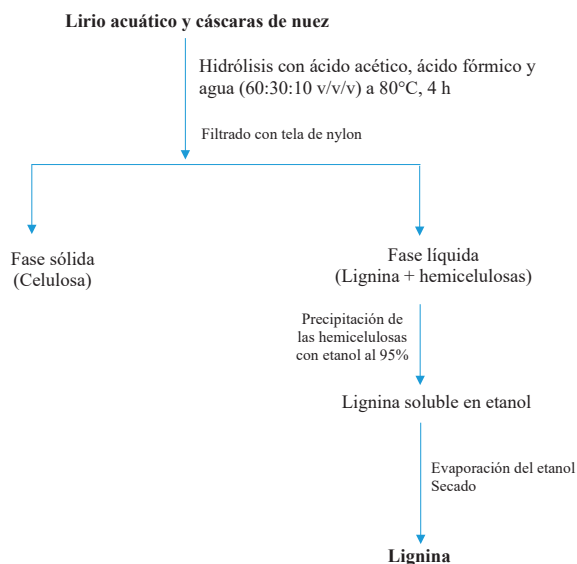


Figura 1. Diagrama general del proceso organosolv utilizado para la extracción de lignina de lirio acuático y de cáscara de nuez pecanera.

Figure 1. General diagram of the organosolv process applied for the extraction of lignin from water hyacinth and pecan nutshell.

Técnicas de caracterización fisicoquímica de lignina

Microscopía electrónica de barrido (MEB). La morfología de la lignina se analizó utilizando MEB (JEOL JSM-5800 LV, Tokio, Japón). El microscopio electrónico estaba equipado con un detector para electrones secundarios y retrodispersos a una aceleración del voltaje de 15 kV. Antes de obtener las imágenes las muestras de lignina fueron recubiertas con una capa de oro.

Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).

El análisis EDS detecta señales de todos los elementos presentes en el material y proporciona un análisis cualitativo. Para dilucidar la composición elemental de las ligninas obtenidas previamente, se empleó MEB equipado con un espectrómetro de dispersión de energía. Se roció cuidadosamente una capa fina de lignina en una cinta de carbono de doble cara montada en porta muestras de aluminio. Todas las muestras se recubrieron con pulverización catódica y se utilizó un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5800 LV, Tokio, Japón) equipado con un detector de electrones retrodispersados en modo de bajo vacío. Cada muestra de lignina se caracterizó examinando todas las partículas observadas dentro de la imagen completa.

Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.

Los espectros de infrarrojo de las ligninas se obtuvieron en un espectrómetro (Perkin Elmer® Spectrum Sistem GX FTIR). Muestras de alrededor de 10 mg de lignina fueron mezcladas con KBr (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI) y se prensaron hasta obtener pellets delgados y transparentes. Las muestras fueron analizadas y las señales de FT-IR se recolectaron en un rango de 4000 y 400 cm^{-1} y se registraron en el modo de transmitancia como función del número de onda.

Análisis termogravimétrico

El porcentaje de pérdida de peso de las muestras como función de la temperatura fue medido por análisis termogravimétricos utilizando un equipo TGA (TA STD Q500 New Castle, DE EE.UU.). Aproximadamente 3 mg de cada lignina fueron calentadas de 25 a 800 °C con un incremento de temperatura de 10 °C/minutos bajo una atmósfera de aire a una velocidad de flujo de 50 mL/minutos.

Actividad antioxidante

Preparación del extracto. Se preparó una solución de cada tipo de lignina usando metanol como disolvente en una relación 1:10 p/v, la cual se obtuvo por agitación durante 10 minutos (Burrell Scientific Wrist Action, modelo 75, Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A.) y posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 10000 g a 25°C (ThermoFisher Scientific, modelo Heraeus Primo R, USA). El sobrenadante (fracción soluble de lignina) se decantó y se llevó a sequedad a 40 °C por 24 h. Con la lignina previamente seca se preparó la solución stock, de la cual se tomó una alícuota de 20 μL (con concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para determinar la actividad antioxidante.

Radical DPPH. La actividad antioxidante se determinó siguiendo el método de Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. La medición consistió en evaluar el descenso de la absorbancia del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de los extractos de las ligninas. El radical se preparó de la siguiente manera, se pesaron 2.5 mg del radical DPPH y se disolvieron en 100 mL de metanol absoluto hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 515 nm. Para el análisis, 20 μL de cada extracto se mezclaron con 200 μL de DPPH, se dejaron reposar durante 30 minutos antes de medir su absorbancia a 515 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad secuestrante de radical.

Radical ABTS. Para la medición de la actividad antioxidante por medio de la captación del radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) se siguió la metodología propuesta por Re *et al.* (1999) con modificaciones. Para la preparación de la solución madre del radical fueron pesados 19.3 mg de ABTS y se disolvieron en 5 mL de agua destilada. Por separado se pesaron 0.0378 g de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) y se agregó 1 mL de agua. De esta solución se tomaron 88 μL y se añadieron a la solución de radical. Enseguida se homogenizó y se dejó reposar en oscuridad durante 16 h a temperatura ambiente. Para la preparación de la solución de trabajo, se tomó 1 mL de la solución del radical y se diluyó con etanol absoluto hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 unidades a 734 nm. Para la medición de la actividad antioxidante, se tomaron 20 μL de cada extracto y se mezclaron con 200 μL del radical. Enseguida se incubó por 30 minutos a 25 °C en ausencia de luz antes de tomar la lectura a 743 nm. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición de la misma forma que el radical DPPH.

Diseño de experimentos y análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó estadística descriptiva y un análisis de varianza (ANOVA) completamente al azar y comparación de medias con el método de Tukey ($p > 0.05$) utilizando el programa Infostat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de la materia prima

Conocer la composición química de nuevas materias primas es información necesaria para poder dar un uso efectivo a estas biomásas. La composición química de la planta de lirio acuático y la cáscara de nuez fue obtenida siguiendo las técnicas de la TAPPI y los resultados se muestran en la Figura 2. Como en toda biomasa lignocelulósica en ambas materias primas los polímeros más abundantes son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Además, se detectó la presencia de componentes minoritarios como compuestos lipídicos y cenizas en cantidades menores al 5 %. Se ha reportado que las plantas de lirio acuático son abundantes en celulosas y hemicelulosas y en menor medida están constituidas por lignina (Guragain *et al.*, 2011).

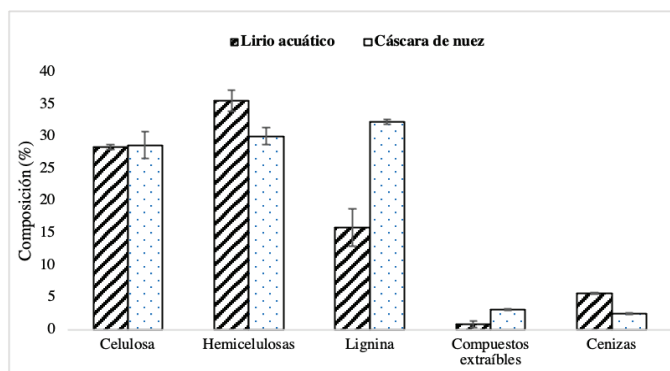


Figura 2. Composición lignocelulósica de lirio acuático y cáscaras de nuez pecanera.

Figure 2. Lignocellulosic composition of water hyacinth and pecan nutshells.

Investigaciones previas han establecido que el contenido de celulosa y hemicelulosa para el lirio acuático se encuentra en un rango de 25 a 50 % (Ahn *et al.* 2012), el contenido de hemicelulosas puede variar desde 17 hasta 40 % (Nigam 2002; Cheng *et al.* 2014), y para la lignina los valores oscilan desde un 2.8 % hasta 32 % (Chanakya *et al.*, 1993; Mukherjee and Nandi 2004; Girisuta *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2010). En este estudio el porcentaje de lignina de las plantas de lirio fue de 15.9 %, este valor se encuentra dentro de los rangos reportados anteriormente. Das *et al.* (2016) concluyeron que la variación en la composición lignocelulósica en las plantas de lirio acuático está relacionado a factores como su localización geográfica, las condiciones de crecimiento y la madurez de la planta. El lirio es una planta herbácea perenne y el contenido de lignina presente en este tipo de plantas (clasificadas como hierbas) puede variar entre 5 y 15 % (Abbasi and Abbasi 2010). El porcentaje de lignina del lirio utilizado en este estudio puede ser comparable con porcentaje de lignina presente en el olote de maíz e incluso más alto que el reportado para algunos pastos (Abbasi and Abbasi 2010). El bajo contenido de lignina en el lirio acuático supone una ventaja para su uso como sustrato para la elaboración de combustibles celulósicos (Ruan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Al comparar el contenido de lignina de las materias primas analizadas en este estudio, se encontró que el porcentaje de lignina en las cáscaras de nuez pecanera fue el doble que el encontrado en las plantas de lirio (Figura 2). Se ha reportado anteriormente que las cáscaras de frutos secos de la familia de nueces contienen grandes cantidades de lignina. Jahirul *et al.* (2012) reportaron que las cáscaras de avellanas, almendras, nuez persa y nuez pecanera contienen desde 20 hasta 52 % de lignina. En este estudio el porcentaje de lignina en las cáscaras de nuez pecanera fue superior al 30 %, coincidiendo con valores obtenidos en otras investigaciones (Li *et al.*, 2018).

El lirio acuático y las cáscaras de nuez pecanera son materiales lignocelulósicos altamente abundantes, renovables y de bajo costo de los cuales se pueden obtener polímeros de interés para la industria de los combustibles

celulósicos como el etanol. Durante la elaboración del etanol lignocelulósico, un paso primordial es la remoción de la lignina para mejorar la accesibilidad de la celulosa para su futura conversión en alcohol. De tal manera que el uso del lirio acuático como materia prima para obtener biocombustibles también podría generar cantidades significativas de lignina, lo cual puede ser importante para lograr una completa valorización de esta maleza acuática (Muktham *et al.*, 2016). Con respecto a la LCN esta ha encontrado aplicaciones en el campo de los biomateriales como relleno reforzante de materiales compuestos, compatibilizante de materiales termoplásticos e ingrediente bioactivo con capacidad antioxidante debido al alto contenido de compuestos fenólicos (Leon-Bejarano *et al.*, 2020).

Rendimiento de extracción

En este estudio se llevó a cabo la extracción de lignina de dos biomásas lignocelulósicas altamente abundantes en el estado de Sonora, pero poco investigadas para este fin. La extracción de lignina se realizó empleado un procedimiento organosolv utilizando AC/AF/AD. Durante el proceso organosolv el polímero de la lignina se rompe en partes pequeñas, se disuelve en la biomasa lignocelulósica y se separa en forma de un licor rico en compuestos fenólicos (Ruiz *et al.*, 2011). Dentro de las ventajas que presenta el uso de ácidos orgánicos para remover lignina se encuentra un mayor rendimiento de extracción comparado con otros procesos utilizados para la remoción de lignina (Xu *et al.*, 2006). Además, los solventes utilizados pueden recuperarse y reutilizarse.

El rendimiento de extracción de lignina de las biomásas evaluadas después del tratamiento con AC/AF/AD se presentan en la Tabla 1. Se puede observar que el rendimiento de extracción fue mayor para la cáscara de nuez pecanera (29 %) en comparación con las plantas de lirio acuático (15 %) . Estos resultados concuerdan con lo reportado en la Figura 2, donde se muestra que existe mayor porcentaje de lignina en las cáscaras de nuez que en el lirio acuático. Durante el proceso organosolv, los ácidos orgánicos impregnan los tejidos de la biomasa; luego, se produce la ruptura de los enlaces lábiles a los ácidos. Al final de este proceso la lignina y la hemicelulosa son solubilizadas, quedando un residuo sólido constituido fundamentalmente por celulosa. Después de un proceso de purificación para remover las hemicelulosas, la lignina puede recuperarse en estado sólido como un polvo color café oscuro altamente abundante en compuestos fenólicos.

Tabla 1. Rendimiento de extracción de lignina de lirio acuático y cáscara de nuez pecanera.

Table 1. Yield of lignin extraction from water hyacinth and pecan nutshell.

	Lignina (g/1g muestra)	Rendimiento (%)
Lirio acuático	0.152 ± 1.1 a	15.2 a
Cáscara de nuez	0.291 ± 0.5 b	29.1 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En general, el uso de ácidos orgánicos permite obtener gran rendimiento de lignina, aunque algunas variables del proceso pueden tener impacto en el rendimiento de extracción. Tales variables son el tiempo de extracción, la concentración de los solventes, la relación sólido-líquido, el uso de catalizadores, la temperatura y el tipo de biomasa (Shui *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2021).

Caracterización fisicoquímica de las ligninas

Morfología y análisis elemental. La morfología y la composición elemental de LLA y LCN se estudió mediante análisis de microscopio electrónico de barrido (SEM). Las imágenes SEM, Figura 3A y 3B muestran que LLA y LCN presentan morfología con formas poco definidas, aparentando partículas rocosas con diferentes tamaños, superficies lisas, continuas y sin grietas. LLA muestra una morfología con una mayor distribución de tamaños de partícula que LCN. Como se puede observar, la extracción de lignina utilizando el método organosolv produce partículas de lignina con superficies continuas. Por el contrario, el proceso Kraft para la obtención de ligninas da como resultado partículas solidas de lignina con formas redondeadas o semiesféricas con muchos volú-

menes abiertos sobre la superficie rugosa. Dicha morfología es el resultado del proceso de concentración para obtener la lignina del licor de cocimiento (Pua *et al.*, 2011). A diferencia de la lignina organosolv, la lignina Kraft se obtiene a partir de plantas leñosas utilizando una solución de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio a temperaturas y presiones elevadas, lo cual produce fragmentación de las partículas de lignina.

Respecto a la composición elemental de LCN y LLA, ambas ligninas destacan por su alto contenido de carbono; no obstante, LLA presentó un mayor porcentaje comparado con LCN. La estructura del polímero de lignina está constituida por grupos funcionales a base de carbono y por enlaces de tipo carbono-carbono, carbono-hidrógeno y carbono-oxígeno. Otros elementos como el azufre, el silicio, el aluminio y el potasio fueron también detectados por análisis EDS (Tabla 2). Tales elementos aparecen por debajo del 0.5 % y son resultado principalmente de trazas de cenizas que quedan en la lignina provenientes de la biomasa de extracción (lirio acuático y cáscara de nuez). Generalmente el contenido de carbono en la lignina puede variar entre 50 y 75 %. Köhnke *et al.* (2019) reportaron el análisis elemental para varios tipos de ligninas. Ellos encontraron que la lignina organosolv, la Kraft y la alcalina presentaron alrededor del 60 % de contenido de carbono, mientras que la lignina conocida como lignosulfonato presentó un menor porcentaje. En este estudio, el alto contenido de carbono encontrado tanto en LCN y LLA demuestran que pueden ser una materia prima apropiada para la elaboración de fibras de carbono.

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopia de infrarrojo es un método no destructivo ampliamente utilizado para analizar de manera rápida y sencilla la vibración de los enlaces de los grupos funcionales presentes en ligninas. El espectro de infrarrojo de ambas ligninas organosolv (LCN y LLA) se muestra en la Figura 4. De manera general, se observan las bandas características del espectro de infrarrojo para el polímero de lignina, aunque el rango y agudeza de las bandas varían ligeramente dependiendo del tipo de lignina. En la Tabla 3 aparecen las principales señales detectadas en LCN y LLA, así como los grupos funcionales a las que pertenecen. La banda que aparece a los 3336 cm^{-1} corresponden al estiramiento de los grupos -OH fenólicos presentes en todas las ligninas. Mientras que la banda detectada alrededor de 2910-2948 cm^{-1} es atribuida al estiramiento C-H en grupos metileno y metoxilo los cuales forman parte del anillo aromático de la lignina. Las bandas observadas en el rango de los 1700 cm^{-1} indican la presencia de grupos carbonilos no conjugados. Específicamente, las bandas a 1716 y 1711 cm^{-1} son atribuidas a la esterificación

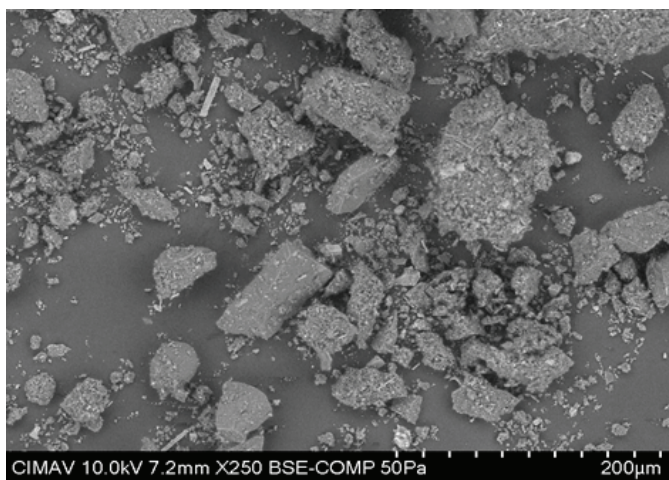
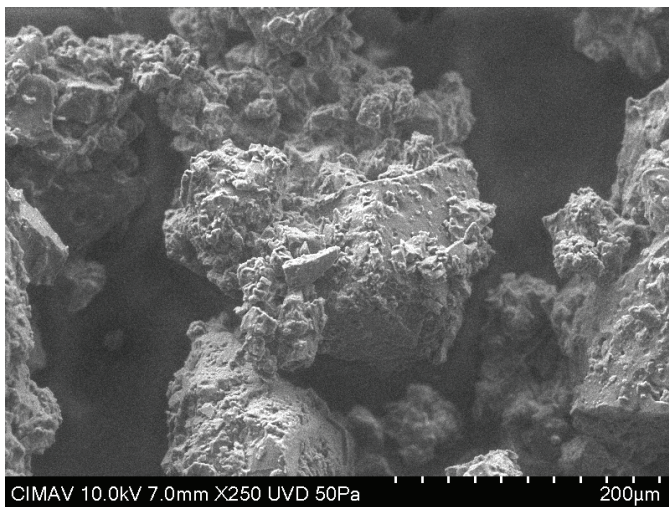


Figura 3. Micrografías de LCN (A) y LLA (B) obtenidas por MEB.
Figure 3. Micrographs of LCN (A) and LLA (B) obtained by SEM.

Tabla 2. Análisis elemental de LLA y LCN obtenidos por EDS.

Table 2. Elemental analysis of LLA and LCN obtained by EDS.

Tipo de lignina	Elementos (%)					
	C	O	S	Si	Al	K
LLA	76.7	22.8	0.2	0.1	ND	0.1
LCN	74.3	23.7	0.1	0.1	0.4	0.5

Lignina de lirio acuático (LLA). Lignina de cáscara de nuez (LCN). Espectroscopia de energía dispersiva (EDS).

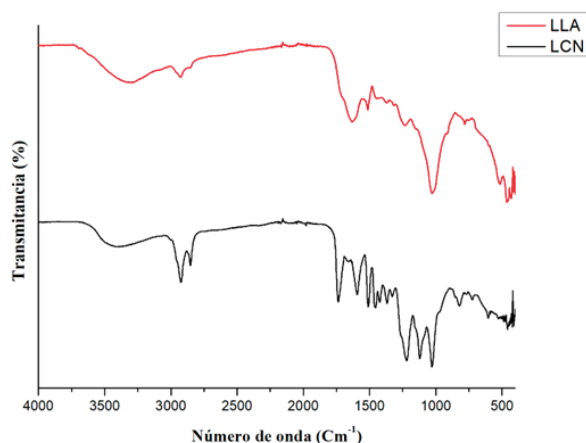


Figura 4. Espectro infrarrojo de LLA y LCN.

Figure 4. Infrared spectrum of LLA and LCN.

de los grupos fenol y alcoholes de la cadena de propano (Ca y Cy) durante el proceso de extracción usando ácido acético y fórmico. La vibración del esqueleto aromático de ambas ligninas se registró en las bandas en el rango de 1508, 1529, y 1628 cm^{-1} . Estas bandas presentaron mayor intensidad en LCN lo que podría indicar mayor grado de conjugación por efecto del tratamiento ácido. Resultados similares fueron obtenidos en estudios que extrajeron lignina de materias primas como la paja de trigo y la fibra de alfalfa sometidas a un proceso organosolv (Sun *et al.*, 2000; Watkins *et al.*, 2015). Igualmente, las señales a los 1300 y 1200 cm^{-1} indican la presencia de las unidades monoméricas siringil y guaiaxil que conforman el polímero de lignina. Estos monómeros son importantes para la producción de compuestos aromáticos de alto valor agregado en la industria petroquímica, la cual utiliza comúnmente recursos fósiles como materias primas.

Comportamiento térmico. Con el objetivo de conocer la estabilidad térmica de LLA y LCN éstas fueron evaluadas a través de análisis térmicos. El comportamiento térmico de las

Tabla 3. Señales obtenidas por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier para LCN y LLA.

Table 3. Infrared spectroscopy signals obtained by Fourier transform for LCN and LLA.

		Número de onda (cm^{-1})	
		LCN	LLA
Estiramiento	-OH fenólicos	3336	3338
Estiramiento	C-H en grupos metileno y metoxilo	2948	2926
Estiramiento	C=O de grupos carbonilo aromáticos	1720	1720
	C=C vibraciones del esqueleto aromático	1592	1628
	C=C vibraciones del esqueleto aromático	1508	1508
Deformación	C-H en grupos metileno y metoxilo	1451	1445
Estiramiento	C=O de unidades siringil (S)	1365	1367
Estiramiento	C=O de unidades guaiaxil (G)	1221	1231
Estiramiento	C-O en grupos éster	1121	ND
Deformación	C-H de unidades guaiaxil (G)	1027	1022

Lignina de lirio acuático (LLA). Lignina de cáscara de nuez (LCN)

ligninas se muestra Figura 5 en forma de curvas termogravimétricas que representan la pérdida de peso de las ligninas en función del aumento de la temperatura. La estructura molecular de la lignina se compone principalmente de anillos aromáticos que tienen diversas ramificaciones y tipos de enlaces. La ruptura de estos enlaces químicos se lleva a cabo en un amplio rango de temperatura durante su degradación (desde 100 a 800 °C) (Yang *et al.*, 2007). En el termograma se pueden observar tres pérdidas de peso principales para ambas ligninas. La primera, corresponde a la evaporación gradual del agua adsorbida por las muestras, lo cual sucede alrededor de los 90 - 100 °C. La segunda pérdida de peso se presenta en el rango de los 200 - 300 °C y está relacionada con la degradación de las hemicelulosas presentes en las ligninas (Tejado *et al.*, 2007). Esta pérdida de peso inició a una temperatura más baja en la LLA y puede estar relacionada con la presencia de un mayor contenido de hemicelulosa. En las plantas herbáceas como el lirio, las hemicelulosas y la lignina forman complejos, el tratamiento de extracción organosolv es capaz de romper los enlaces que mantienen unidos tales complejos, aunque siempre persisten pequeños remanentes de hemicelulosa incluso después del proceso de purificación de la lignina (Buranov and Mazza 2008).

La tercera pérdida de peso ocurrió en un rango de temperaturas desde 300 hasta los 600°C en ambas ligninas. Por encima de los 300 °C sucede la ruptura de los enlaces β -O-4 que mantienen unido al polímero de lignina (Chu *et al.*, 2013). Por encima de los 400 °C se produce la descomposición de los anillos aromáticos y el rompimiento de los enlaces C-C en las cadenas alifáticas de la lignina. Seguido de la liberación de los grupos OCH_3 de los anillos aromáticos a 550 °C lo que lleva a la formación del residuo carbonoso (El Kaihal *et al.*, 2018).

La pérdida de peso de la LLA inició a menor temperatura que para la LCN, sin embargo, el residuo carbonoso de LLA fue mayor (20 % en peso) que el que presentó LCN (~5 % en peso). Esto se debe a que la LLA tiene mayor resistencia a altas temperaturas, ya que entre los 500 a 800 °C, el porcentaje en peso de la LLA se mantuvo estable. La presencia de altos

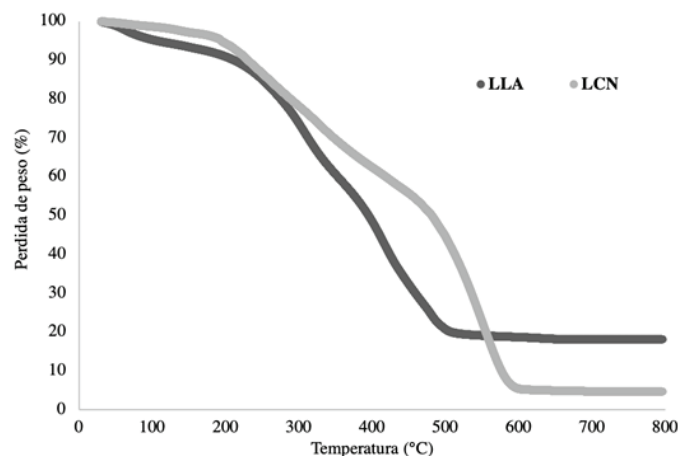


Figura 5. Análisis termogravimétrico de LLA y LCN.

Figure 5. Thermogravimetric analysis of LLA and LCN

remanentes de residuo carbonoso está relacionada con una mayor estabilidad térmica del polímero de lignina.

Actividad antioxidante

La lignina es un polímero aromático que contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos que le permiten actuar como antioxidante. Los resultados de la actividad antioxidante de LLA y LCN expresada como porcentaje de inhibición de los radicales DPPH y ABTS se muestran en la Tabla 4. La capacidad para inhibir a los radicales se estudió para cada tipo de lignina en 3 sistemas de solventes: etanol, metanol, etanol-metanol (50:50 v/v). De acuerdo con el análisis de varianza, tanto el tipo de lignina como el tipo de solvente presentaron un efecto significativo en la inhibición de los radicales DPPH y ABTS ($p < 0.0001$). De manera general, la LCN mostró un mayor porcentaje de inhibición en ambos radicales en comparación con la LLA. Del mismo modo, se observó que la mayor actividad inhibitoria en las ligninas estudiadas se encontró en la fracción soluble en la mezcla etanol-metanol (50:50 v/v) seguido de la fracción soluble en metanol.

Sakagami *et al.* (2005) reportó que la eficacia de la lignina como antioxidante está relacionada con su estructura química y su solubilidad. Investigaciones previas muestran que la lignina de tipo organosolv es altamente soluble en etanol y metanol (Arshanitsa *et al.*, 2013). Esto puede ser explicado por la teoría de Hildebrand (Quesada-Medina *et al.*, 2010). La teoría menciona que los solventes orgánicos con mayor capacidad para solubilizar la lignina son aquellos con un parámetro de solubilidad de Hildebrand cercano a 22.5 MPa^{1/2} y el aumento de este valor da como resultado mayor solubilidad (Schuerch, 1952). Los parámetros de solubilidad que presentan el etanol y el metanol son de 26.2 y 36.2 MPa^{1/2} respectivamente.

La lignina es un polímero aromático con una estructura química compleja, que contiene gran cantidad de anillos aromáticos con grupos funcionales hidroxilo y metoxilos. Para la actividad antioxidante de la lignina, los grupos hidroxilo fenólicos libres y la sustitución orto-metoxi en los anillos aromáticos es esencial. La presencia de estos grupos funcionales permite terminar reacciones de propagación de

oxidación inducidas por el oxígeno y sus especies reactivas (Arshanitsa *et al.*, 2013). En este trabajo se encontró que la LLA presentó menor capacidad antioxidante en comparación con la LCN. Dicho comportamiento podría deberse a una menor solubilidad de la LLA en los solventes evaluados, así como a la presencia de grupos hidroxilo alifáticos y polisacáridos como la hemicelulosa. Se ha reportado que la presencia de hemicelulosas tiene la capacidad de cambiar la polaridad de la lignina, lo cual disminuye la cantidad de sus compuestos fenólicos (Mahmood *et al.*, 2018). Además, la presencia de hemicelulosa también puede disminuir la capacidad antioxidante de la lignina debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre los carbohidratos y los grupos -OH fenólicos de la lignina que posteriormente interfieren con las propiedades antioxidantes (García *et al.* 2010; Dizhbite *et al.* 2004). Azadfar *et al.* (2015) estudiaron la actividad antioxidante en lignina organosolv de paja de trigo y encontraron 86.9% de inhibición del radical DPPH. En este trabajo, resultados similares en el porcentaje de inhibición del radical DPPH fueron encontradas en la fracción de LCN solubilizada en mezclas de etanol-metanol 50:50 v/v. Asimismo, LCN mostró un porcentaje de inhibición cercano a los encontrados en antioxidantes comerciales como el hidroxitolueno butilado (BHT), ácido ferúlico o el guayacol.

Las investigaciones realizadas sobre la actividad antioxidante de cáscara de nuez pecaneras concuerdan en que los principales componentes de estos residuos son el ácido clorogénico, taninos condensados, epigallocatequina, catequina galato, y ácido gálico (Prado *et al.*, 2013). Tales compuestos han demostrado tener una actividad biológica antioxidante, y se ha encontrado mayor presencia de ellos en las cáscaras que en el fruto de la nuez (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2007; Pinheiro do Prado *et al.*, 2009). En los resultados obtenidos (Tabla 4) se observó que la LCN mostró gran capacidad para inhibir los radicales DPPH y ABTS y dicha inhibición fue mayor cuando se usó mezcla de solventes. Kurek *et al.* (2018) reportaron alto contenido de compuestos fenólicos, taninos condensados y alta actividad antioxidante en extractos de cáscara de nuez comparado con extractos acuosos. La alta actividad antioxidante encontrada en la LCN indica que puede ser utilizada como materia prima para aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria.

Tabla 4. Actividad antioxidante de LCN y LLA contra los radicales DPPH y ABTS.

Table 4. Antioxidant activity of LCN and LLA against DPPH and ABTS radicals.

Solvente		DPPH (%)	ABTS (%)
Etanol	LLA	5.70 ± 2.38 a	3.05 ± 0.59 a
	LCN	20.65 ± 3.41 b	12.60 ± 0.44 b
Metanol	LLA	18.32 ± 0.96 b	12.52 ± 0.73 b
	LCN	66.08 ± 4.39 d	46.40 ± 1.56 d
Etanol/Metanol 50:50 (v/v)	LLA	29.71 ± 1.19 c	21.17 ± 0.65 c
	LCN	86.20 ± 5.20 e	56.36 ± 0.98 e

Lignina de lirio acuático (LLA). Lignina de cáscara de nuez (LCN). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$). 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).

CONCLUSIONES

Esta investigación presenta por primera vez la extracción de lignina de lirio acuático y cáscaras de nuez pecanera utilizando un proceso organosolv. Los resultados de la caracterización de las materias primas demostraron que el tratamiento de materiales lignocelulósicos no convencionales con ácidos orgánicos es efectivo para la separación de los principales componentes químicos. Bajo las condiciones establecidas en el proceso organosolv, el rendimiento de extracción fue considerablemente mayor para la LCN en comparación con la LLA. Ambas ligninas presentaron alto contenido de carbono y muy bajo contenido de impurezas de origen mineral. Los resultados de la espectroscopía de infrarrojo

mostraron las vibraciones típicas de las estructuras químicas de ligninas extraídas utilizando solventes orgánicos. La LLA presentó mayor estabilidad térmica y mayor residuo carbonoso que la LCN. La LLA presentó excelentes propiedades de resistencia a la temperatura siendo estable térmicamente en el rango de 500 hasta 800 °C. Finalmente, la LCN presentó una gran capacidad de inhibir los radicales DPPH y ABTS en los solventes evaluados, por encima de la LLA. Los resultados de este estudio sugieren la valorización potencial de dos residuos lignocelulósicos altamente abundantes los cuales se pueden separar efectivamente en sus principales polímeros y dar a estas moléculas una aplicación específica. Además, las cáscaras de nuez pecanera representan una fuente abundante y sostenible de compuestos fenólicos tales como ligninas y taninos con un gran potencial como antioxidantes.

AGRADECIMIENTOS

El Dr. José Luis Espinoza Acosta agradece al Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP) por el financiamiento para la realización del proyecto con folio CESUES-PTC-028. Los autores desean agradecer a Claudia Hernández Escobar, Karla Campos, Daniel Lardizábal y Luis de la Torre por su apoyo con las técnicas de caracterización de las ligninas.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflictos de interés.

REFERENCIAS

- Abbasi, T., and Abbasi, S. A. (2010). "Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3): 919–937. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.006>
- Ahn, D. J., Kim, S. K., and Yun, H. S. (2012). "Optimization of pretreatment and saccharification for the production of bioethanol from water hyacinth by *Saccharomyces cerevisiae*." *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1): 35–41. DOI: 10.1007/s00449-011-0600-5
- Arshanitsa, A., Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Andersone, A., Gosselink, R. J. A., van der Putten, J., Lauberts, M., and Telysheva, G. (2013). "Fractionation of technical lignins as a tool for improvement of their antioxidant properties." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 103: 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.12.023>
- Azadfar, M., Gao, A. H., Bule, M. V, and Chen, S. (2015). "Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol." *International Journal of Biological Macromolecules*, 75: 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.049>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Buranov, A. U., and Mazza, G. (2008). "Lignin in straw of herbaceous crops." *Industrial Crops and Products*, 28(3): 237–259. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.008>
- Chanakya, H. N., Bargaonkar, S., Meena, G., and Jagadish, K. S. (1993). "Solid-phase biogas production with garbage or water hyacinth." *Bioresource Technology*, 46(3): 227–231. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90125-U](https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90125-U)
- Cheng, J., Wang, X., Huang, R., Liu, M., Yu, C., and Cen, K. (2014). "Producing Ethanol from Water Hyacinth through Simultaneous Saccharification and Fermentation with Acclimatized Yeasts." *BioResources*, 9(4): 7666–7680. DOI: 10.15376/biores.9.4.7666-7680
- Chu, S., Subrahmanyam, A. V, and Huber, G. W. (2013). "The pyrolysis chemistry of a β -O-4 type oligomeric lignin model compound." *Green Chemistry*, 15(1), 125–136. <https://doi.org/10.1039/C2GC36332A>
- Das, A., Ghosh, P., Paul, T., Ghosh, U., Pati, B. R., and Mondal, K. C. (2016). "Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)." *3 Biotech*, 6(1): 70. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0385-y>
- Dizhbite, T., Telysheva, G., Jurkjane, V., and Viesturs, U. (2004). "Characterization of the radical scavenging activity of lignins—natural antioxidants." *Bioresource Technology*, 95(3): 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.024>
- El Kaihal, A., Moustaqim, M., Elmarouani, M., Men-La-Yakhaf, S., Kifani-Sahban, F., Taibi, M., El Hajjaji, S., and Sebbahi, S. (2018). "Thermal and thermomechanical analyses of lignin." *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9(1): 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.002>
- Espinoza-Acosta, J. L., Torres-Chávez, P. I., Carvajal-Millán, E., Ramírez-Wong, B., Bello-Pérez, L. A., and Montañón-Leyva, B. (2014). "Ionic liquids and organic solvents for recovering lignin from lignocellulosic biomass." *BioResources*, 9(2), 3660–3687. DOI: 10.15376/biores.9.2.3660-3687
- García, A., Toledano, A., Andrés, M. Á., and Labidi, J. (2010). "Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins." *Process Biochemistry*, 45(6): 935–940. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.02.015
- Ghorbani, M., Liebner, F., van Herwijnen, H. W. G., Pfunzen, L., Krahofer, M., Budjav, E., and Konnerth, J. (2016). "Lignin phenol formaldehyde resoles: The impact of lignin type on adhesive properties." *BioResources*, 11(3), 6727–6741. DOI: 10.15376/biores.11.3.6727-6741
- Girisuta, B., Danon, B., Manurung, R., Janssen, L. P. B. M., and Heeres, H. J. (2008). "Experimental and kinetic modelling studies on the acid-catalysed hydrolysis of the water hyacinth plant to levulinic acid." *Bioresource Technology*, 99(17): 8367–8375. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.045>
- Guragain, Y. N., De Coninck, J., Husson, F., Durand, A., and Rakshit, S. K. (2011). "Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth." *Bioresource Technology*, 102(6): 4416–4424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.125>
- Jahirul, M. I., Rasul, M., Chowdhury, A., and Ashwath, N. (2012). "Biofuels Production through Biomass Pyrolysis —A Technological Review." *Energies*, 5: 4952–5001. <https://doi.org/10.3390/en5124952>
- Köhnke, J., Gierlinger, N., Prats Mateu, B., Unterweger, C., Solt, P., Mahler, K., Schwaiger, E., Liebner, F., and Gindl-Altmatter, W. (2019). "Comparison of four technical lignins as resource for electrically conductive carbon particle." *Bioresources*, 14: 1091–1109. DOI: 10.15376/biores.14.1.1091-1109

- Kureck, I., Policarpi, P. de B., Toaldo, I. M., Maciel, M. V. de O. B., Bordignon-Luiz, M. T., Barreto, P. L. M., and Block, J. M. (2018). "Chemical Characterization and release of polyphenols from pecan nut shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] in zein microparticles for bioactive applications." *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2): 137–145. DOI: 10.1007/s11130-018-0667-0.
- Lara-Serrano, J. S., Rutiaga-Quiñones, O. M., López-Miranda, J., Fileto-Pérez, H. A., Pedraza-Bucio, F. E., Rico-Cerda, J. L., and Rutiaga-Quiñones, J. G. (2016). "Physicochemical characterization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)." *BioResources*, 11(3): 7214–7223. DOI: 10.15376/biores.11.3.7214-7223
- Leon-Bejarano, M., Durmus, Y., Ovando-Martínez, M., and Simsek, S. (2020). "Physical, barrier, mechanical, and biodegradability properties of modified starch films with nut by-products extracts." *Foods*, 9(2): 226. <https://doi.org/10.3390/foods9020226>
- Li, X., Liu, Y., Hao, J., and Wang, W. (2018). "Study of Almond Shell Characteristics." *Materials* (Basel, Switzerland), 11(9): 1782. <https://doi.org/10.3390/ma11091782>
- Ma, F., Yang, N., Xu, C., Yu, H., Wu, J., and Zhang, X. (2010). "Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth." *Bioresource Technology*, 101(24), 9600–9604. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.084>
- Mahmood, Z., Yameen, M., Jahangeer, M., Riaz, M., Ghaffar, A., & Javid, I. (2018). "Lignin as Natural Antioxidant Capacity." *Lignin Trends and Applications*, M. Yameen, ed., IntechOpen, Rijeka, 181–205. DOI: 10.5772/intechopen.73284
- Mattinen, M.-L., Riviere, G., Henn, A., Nugroho, R. W. N., Leskinen, T., Nivala, O., Valle-Delgado, J. J., Kostianen, M. A., and Österberg, M. (2018). "Colloidal lignin particles as adhesives for soft materials." *Nanomaterials*, 8(12): 1001. <https://doi.org/10.3390/nano8121001>
- Mukherjee, R., and Nandi, B. (2004). "Improvement of in vitro digestibility through biological treatment of water hyacinth biomass by two *Pleurotus* species." *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53: 7–12. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00112-4)
- Muktham, R., Bhargava, S., Bankupalli, S., and Ball, A. (2016). "A review on 1 st and 2 nd generation bioethanol production-recent progress." *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 6: 72–92. DOI: 10.4236/jsbs.2016.63008
- Nigam, J. N. (2002). "Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast." *Journal of Biotechnology*, 97(2): 107–116. DOI: 10.1016/S0168-1656(02)00013-5
- Pinheiro do Prado, A. C., Monalise Aragão, A., Fett, R., and Block, J. M. (2009). "Antioxidant Properties of Pecan Nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell Infusion." *Grasas y Aceites*, 60(4): 330–335. DOI: <https://doi.org/10.3989/gya.107708>
- Pouteau, C., Dole, P., Cathala, B., Averous, L., and Boquillon, N. (2003). "Antioxidant properties of lignin in polypropylene." *Polymer Degradation and Stability*, 81(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00057-0)
- Prado, A. C. P. do, Manion, B. A., Seetharaman, K., Deschamps, F. C., Barrera Arellano, D., and Block, J. M. (2013). "Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]." *Industrial Crops and Products*, 45: 64–73. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.11.042
- Pua, F., Fang, Z., Zakaria, S., Guo, F., and Chia, C. (2011). "Direct production of biodiesel from high-acid value *Jatropha* oil with solid acid catalyst derived from lignin." *Biotechnology for Biofuels*, 4(1): 56. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-56>
- Qin, Z., Cheng, X.-C., Liu, H.-M., Yang, Q.-L., and Wang, X.-D. (2021). "Extraction of lignin from Chinese quince fruit by acetic acid solution at above atmospheric pressure: Yield distribution, structural characterization, and antioxidant activities." *Chemical Papers*, 75(7): 3155–3167. DOI: 10.1007/s11696-021-01561-7
- Qu, W., Yang, J., Sun, X., Bai, X., Jin, H., and Zhang, M. (2021). "Towards producing high-quality lignin-based carbon fibers: A review of crucial factors affecting lignin properties and conversion techniques." *International Journal of Biological Macromolecules*, 189: 768–784. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.187>
- Quesada-Medina, J., López-Cremades, F. J., and Olivares-Carrillo, P. (2010). "Organosolv extraction of lignin from hydrolyzed almond shells and application of the δ -value theory." *Bioresource Technology*, 101(21): 8252–8260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.011>
- Ragauskas, A. J., Beckham, G. T., Bidy, M. J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M. F., Davison, B. H., Dixon, R. A., Gilna, P., Keller, M., Langan, P., Naskar, A. K., Saddler, J. N., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., and Wyman, C. E. (2014). "Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery." *Science*, 344(6185): 1246843. DOI: 10.1126/science.1246843
- 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): 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rezania, S., Md Din, M. F., Eva Mohamad, S., Sohaili, J., Mat Taib, S., Mohd Yusof, M. B., Kamyab, H., Darajeh, N., and Ahsan, A. (2017). "Review on pretreatment methods and ethanol production from cellulosic water hyacinth." *BioResources*, 12(1): 2108–2124. DOI: 10.15376/biores.12.1.Rezania
- Ruan, T., Zeng, R., Yin, X.-Y., Zhang, S.-X., and Yang, Z.-H. (2016). "Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) biomass as a biofuel feedstock by enzymatic hydrolysis." *BioResources*, 11(1): 2372–2380. DOI: 10.15376/biores.11.1.2372-2380
- Ruiz, H. A., Ruzene, D. S., Silva, D. P., da Silva, F. F. M., Vicente, A. A., and Teixeira, J. A. (2011). "Development and characterization of an environmentally friendly process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(5): 629–641. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9163-9>
- Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., and Fujisawa, S. (2005). "Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities." *Phytochemistry*, 66(17): 2108–2120. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.05.013.

- Schuerch, C. (1952). "The solvent properties of liquids and their relation to the solubility, swelling, isolation and fractionation of lignin." *Journal of the American Chemical Society, American Chemical Society*, 74(20): 5061–5067. <https://doi.org/10.1021/ja01140a020>
- Shui, T., Feng, S., Yuan, Z., Kuboki, T., and Xu, C. (Charles). (2016). "Highly efficient organosolv fractionation of cornstalk into cellulose and lignin in organic acids." *Bioresource Technology*, 218: 953–961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.054>
- Sun, R., Tomkinson, J., and Lloyd Jones, G. (2000). "Fractional characterization of ash-AQ lignin by successive extraction with organic solvents from oil palm EFB fibre." *Polymer Degradation and Stability*, 68(1): 111–119. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(99\)00174-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(99)00174-3)
- Tejado, A., Peña, C., Labidi, J., Echeverria, J. M., and Mondragon, I. (2007). "Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis." *Bioresource Technology*, 98(8): 1655–1663. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.042>
- Villarreal-Lozoya, J. E., Lombardini, L., and Cisneros-Zevallos, L. (2007). "Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars." *Food Chemistry*, 102(4): 1241–1249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.024>
- Watkins, D., Nuruddin, M., Hosur, M., Tcherbi-Narteh, A., and Jeelani, S. (2015). "Extraction and characterization of lignin from different biomass resources." *Journal of Materials Research and Technology*, 4(1): 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2014.10.009>
- Wise, L. E., Murphy, M., and Adieco, A. A. D. (1946). "A chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicelluloses." *Technical Association of the Pulp & Paper Industry*, 29(1): 210–218.
- Xu, F., Sun, J.-X., Sun, R., Fowler, P., and Baird, M. S. (2006). "Comparative study of organosolv lignins from wheat straw." *Industrial Crops and Products*, 23(2): 180–193. DOI: 10.1016/j.indcrop.2005.05.008
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., and Zheng, C. (2007). "Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis." *Fuel*, 86(12): 1781–1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>
- Zakzeski, J., Bruijninx, P. C. A., Jongerius, A. L., and Weckhuysen, B. M. (2010). "The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals." *Chemical Reviews*, 110(6): 3552–3599. <https://doi.org/10.1021/cr900354u>
- Zhang, Q., Weng, C., Huang, H., Achal, V., and Wang, D. (2016). "Optimization of bioethanol production using whole plant of water hyacinth as substrate in simultaneous saccharification and fermentation process." *Frontiers in Microbiology*, 6(1): 1411. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01411

Predicción de la producción y rendimiento de frijol, con modelos de redes neuronales artificiales y datos climáticos

Prediction of bean production and yields, with artificial neural network models and climate data

Servín-Palestina M¹, Salazar-Moreno R^{1*}, López-Cruz IL¹, Medina-García G², Cid-Ríos JA²

¹ Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, CP 56230, Chapingo, Estado de México, México.

² Campo Experimental Zacatecas. INIFAP. Carretera Zacatecas-Fresnillo km 24.5, CP 98600. Calera Zacatecas, México.

RESUMEN

El estado de Zacatecas ocupa el primer lugar en la producción de frijol de temporal en México, dada la importancia de las variables climatológicas, los objetivos de este trabajo fueron: 1) desarrollar modelos de redes neuronales artificiales RNA para la predicción de la superficie cosechada (SC), los rendimientos (Rto) y la producción (P) de frijol de temporal en el estado de Zacatecas, empleando datos del periodo 1988-2019, y 2) realizar el análisis de sensibilidad para determinar las variables de entrada que tienen mayor influencia en la producción y rendimiento de frijol. Se usó la librería Climatol del paquete estadístico R, para el llenado de datos faltantes. Los modelos de RNA son capaces de detectar la influencia del clima en la producción de frijol. La eficiencia global en los modelos RNA fue de 0.89 para Rto y 0.86 para SC. La producción se estimó con los modelos de RNA para Rto y SC y se obtuvo un $R^2 = 0.80$. De acuerdo al análisis de sensibilidad, la evaporación del ciclo del cultivo (Eva) fue la variable más importante en la predicción del rendimiento, mientras que la precipitación de agosto (Pp_Ago) y la temperatura mínima (Tmin) influyeron más en la producción.

Palabras clave: Inteligencia artificial, Zacatecas, temperatura, precipitación, cultivos de temporal, *Phaseolus vulgaris*, L.

ABSTRACT

The state of Zacatecas ranks first in the production of rainfed beans in Mexico. Due to the importance of climatological variables, the objectives of this work were 1) to develop artificial neural networks (ANN) models of for the harvested surface (SC), yields (Rto) and production (P) prediction of rainfed beans in the state of Zacatecas, using data from the 1988-2019 period, and 2) perform the sensitivity analysis to determine the input variables that have the greatest influence on bean production and yield. The Climatol library of the R statistical package was used to fill in missing data. The results show that the ANN models capture the influence of climate on bean production, with an overall efficiency of 0.89 for Rto and 0.86 for SC. The production was estimated using the outputs, Rto and SC, from ANN models and an $R^2 = 0.80$ was obtained. According to the sensitivity analysis, evaporation of the cycle (Eva) was the most important variable for predicting yield, while precipitation in August (Pp_Ago) and minimum temperature (Tmin) had a greater influence on production.

Keywords: Artificial intelligence, Zacatecas, temperature, rainfall, rainfed crops, *Phaseolus vulgaris*, L.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Stacey *et al.* (2015) la producción de alimentos debe incrementarse en un 70 % para el año 2050, lo cual es difícil de alcanzarse en un escenario de cambio climático y de agotamiento de recursos naturales. Las zonas de temporal son las más afectadas debido a la variabilidad de la distribución temporal y espacial de la precipitación (Esquivel *et al.*, 2016; Trethowan *et al.*, 2010). Este fenómeno ha provocado reducción en la producción agrícola especialmente en el altiplano semiárido templado del centro-norte de México (Osuna *et al.*, 2019).

Actualmente, el estado de Zacatecas ocupa el primer lugar en la producción de frijol en México, con una superficie cosechada en el año 2019 de 395 mil ha y rendimiento promedio de 0.55 t ha⁻¹. Con respecto al año 2018, la superficie cosechada se redujo en 60 %, debido a que las condiciones climáticas ocasionaron el siniestro de 108 mil ha sembradas (SIAP, 2019). Por esta razón, es necesario contar con herramientas que permitan relacionar la producción agrícola con las condiciones climáticas. La modelación numérica con datos climáticos toma importancia para predecir eventos (Grageda *et al.*, 2012) y pronosticar requerimientos hídricos (Ruiz-Del-Angel *et al.*, 2019). Las redes neuronales artificiales son modelos de caja negra (estáticos o dinámicos) que permiten manejar relaciones no lineales entre variables de entrada y salida de un sistema, mediante elementos llamados nodos y sus interconexiones que imitan las neuronas de los sistemas biológicos (Hagan *et al.*, 1996). Las RNA son modelos capaces de encontrar relaciones de forma inductiva por medio de algoritmos de aprendizaje y datos existentes, utilizadas para clasificar, identificar, diagnosticar, optimizar y predecir, se basan en la analogía del comportamiento del cerebro humano (Fausett, 2006).

Los modelos de redes neuronales artificiales (RNA), han sido utilizados con éxito para tratar problemas en la agricultura moderna, en donde se integran variables climatológicas, del cultivo y manejo. Abraham *et al.* (2020) compararon los modelos RNA con métodos clásicos, con base en el error medio absoluto (MAE), error cuadrado medio (MSE) y coeficiente de determinación (R^2), los autores concluyeron que las RNA tuvieron mejor desempeño para predecir su-

perficie cosechada y producción de soya, mientras que los modelos clásicos fueron mejores para estimar el rendimiento. Khan *et al.* (2020) utilizaron tres algoritmos de aprendizaje (Levenberg-Marquardt (LM), scale conjugate gradient back propagation (SCG), Bayesian regularization back propagation (BR)) de RNA para predecir la producción de frutas en Pakistán, obtuvieron valores de R^2 de 65.6, 70.2 y 76.3 respectivamente y concluyeron que las redes neuronales predicen periódicamente las tendencias de la producción agrícola de frutas. Maimaitijiang *et al.* (2020) estimaron los rendimientos de tres variedades de soya en Columbia, Missouri, USA, con la implementación de tres técnicas de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR), regresión aleatoria de bosques (RFR) y redes neuronales artificiales (RNA), utilizando las firmas espectrales, imágenes térmicas y textura del dosel como variables de entrada, concluyeron que el modelo de RNA tuvo el mejor desempeño ($R^2 = 0.720$ y $RMSE = 15.9\%$).

Una vez que el modelo de RNA ha sido generado, es necesario realizar el análisis de sensibilidad (AS) el cual permite particionar la incertidumbre en cada una de las entradas (Saltelli, 2002), a fin de identificar las variables más importantes que predicen la salida del modelo de RNA. Iriyoyen *et al.* (2012) realizaron un AS en RNA entrenadas para estimar la lámina de riego en maíz (Lr), con componentes del balance de agua (BHC) y estado de desarrollo del cultivo y concluyeron que los BHC son más sensibles para estimar la lámina de riego a los primeros 60 cm de profundidad del suelo.

Asimismo, García *et al.* (2020) estimaron el rendimiento de grano de maíz con una RNA multicapa, utilizando variables de entrada obtenidas de imágenes multiespectrales y datos colectados in-situ y obtuvieron un coeficiente de correlación entre los rendimientos observados y simulados mayores al 85 %, de igual manera, el análisis de sensibilidad mostró que el índice de vegetación y la densidad de plantas tiene mayor importancia relativa para la estimación de rendimiento.

Predecir la producción y rendimiento ayuda a: 1) dirigir los recursos para generar tecnologías que incrementen el rendimiento, 2) enfocar esfuerzos para mitigar el efecto del clima, 3) generar políticas gubernamentales para aumentar la productividad, 4) servir de base para los pagos de seguros y préstamos para la producción de frijol (Intell, 2013; Crane, 2018). Los modelos RNA son capaces de predecir fenómenos altamente no lineales y de allí su utilidad en la determinación de la disponibilidad de grano de frijol con anticipación. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) desarrollar modelos de RNA para la predicción de la superficie cosechada, los rendimientos y la producción de frijol de temporal en el estado de Zacatecas, empleando datos de temperatura máxima y mínima del aire, precipitación y evaporación durante el periodo 1988-2019; 2) realizar un análisis de sensibilidad para determinar cuáles variables de entrada tienen mayor influencia en la producción y rendimiento de frijol. La hipótesis es que los modelos de RNA son capaces de predecir de manera aceptable las variables producción, superficie cosechada y rendimiento de frijol utilizando como variables de entrada factores climáticos y de manejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

La "zona frijolera" en el estado de Zacatecas está ubicada al noroeste del estado, en las coordenadas 23°53'02" latitud Norte y 103°01'33" longitud Oeste, con una altura media de 1883 m.s.n.m. los suelos son tipo aluvión. La precipitación media anual es de 472.4 mm. La mayor precipitación se presenta en los meses de julio-septiembre, en donde se concentra el 63 % de la precipitación anual. La temperatura media anual y máxima mensual es de 16.8 °C y 29.5 °C, respectivamente. La evapotranspiración potencial media de 1 389 mm por año (Medina y Ruiz, 2004). Debido a las características climáticas anteriores la producción de frijol de temporal se lleva a cabo de julio a septiembre.

Obtención de datos

La base de datos climáticos (1988-2019) se obtuvo de la estación número 32021 del servicio meteorológico nacional (SMN, 2010) (Estación A), ubicada en la colonia Gonzáles Ortega (-103.44° O, 23.956° N) con datos diarios del 1988 a 2004, y de la estación agroclimática automatizada Col. González Ortega, de la red de monitoreo agroclimático del estado de Zacatecas, CEZAC-INIFAP (Medina *et al.*, 2007) (Estación B), ubicada a -103.45° O, 23.966° N y con datos diarios del 2005 al 2019. Ambas localizadas a 2014 msnm con una separación de 1.5 km, las cuales representan las condiciones climáticas para la producción de frijol de temporal en Zacatecas denominada como la "zona frijolera" (Galindo y Zandate, 2006).

Para el presente trabajo se utilizaron los datos climatológicos de junio a septiembre de: temperatura mínima (Tmin), temperatura máxima (Tmax), precipitación (Pp) y evaporación (Eva) de los meses de julio a septiembre, meses de producción de frijol de temporal en Zacatecas (Medina *et al.*, 2003). Los datos de radiación solar no se incluyen, debido a que no están disponibles durante el periodo 1988 a 2004. Sin embargo, la evaporación la incluye de manera indirecta (SMN, 2010).

Datos faltantes

Fue necesario un pre-procesamiento de ambas estaciones climáticas que consistió en: 1) Estimación de datos climáticos faltantes del año 1988 al 2004 de la estación A, 2) Estimación de evaporación de la estación B en función de evapotranspiración potencial, 3) Estadísticas descriptivas de las variables climáticas del ciclo de producción.

La estimación de datos faltantes para la estación A se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico R mediante la librería de *Climatol* (Guijarro, 2018), usando dos estaciones aledañas 32028 y 32054 ubicadas en Juan Aldama y Sombrerete respectivamente. *Climatol* usa la homogenización de las estaciones para rellenar los datos faltantes a partir de las series más próximas. Se adaptó el método de Paulhus y Kohler (1952), para rellenar precipitaciones diarias mediante promedios de valores aledaños, normalizados mediante división por sus respectivas medias utilizando el método de estandarización de la ecuación 1.

$$x = \frac{(X - \bar{X})}{S_x} \quad (1)$$

Donde: x es normalización de la precipitación, \bar{X} y S_x es la media y desviación estándar de una serie X respectivamente.

Climatol obtiene los parámetros anteriores con los datos disponibles en cada serie, rellena los datos faltantes usando \bar{X}_i y S_{x_i} . Se calculan nuevamente las series rellenas con nuevos parámetros de \bar{X}_{i+1} y $S_{x_{i+1}}$, lo anterior se hace de manera recursiva hasta que las medias no cambian. Una vez estabilizadas las medias, se normalizan todos los datos y se procede a estimarlos (datos existentes y no existentes en todas las series) mediante la expresión (2):

$$\hat{y} = \frac{\sum_{j=1}^n w_j x_j}{\sum_{j=1}^n w_j} \quad (2)$$

Donde: \hat{y} es un dato estimado mediante los correspondientes $n=10$ datos x_j más próximos disponibles en paso temporal, y w_j es el peso asignado a cada uno de ellos en función de la distancia de la estación (Guijarro, 2002).

De la estación B se obtuvieron datos de evapotranspiración potencial (ET_o) estimados mediante la ecuación Penman-Monteith (Allen *et al.*, 2006). Raghuwanshi y Wallender (1998) mencionan que hay una relación entre la evapotranspiración potencial (ET_o) y la evaporación. Según Silva (1998) la evapotranspiración potencial (ET_o) se puede determinar a partir de las mediciones de evaporación (Eva) con base en unos coeficientes empíricos que dependen del suelo, tipo de cultivo, régimen de lluvias entre otros factores, como se expresa en la Ecuación 3:

$$ET_o = K * Eva \quad \therefore \quad Eva = \frac{ET_o}{K} \quad (3)$$

Donde: K es un coeficiente para el período de tiempo determinado, cuyo valor oscila entre 0.5 y 0.9, el cual depende de la intensidad y la distribución de las precipitaciones. Se utilizó el coeficiente K igual a 0.78 que se obtuvo al relacionar la ET_o de la estación Gonzales Ortega y Eva de la estación 32021 con los datos existentes del 2007 y 2008 ($n=555$).

VARIABLES DE ENTRADA Y SALIDA

Las estadísticas descriptivas de las variables climáticas del ciclo de producción del mes de julio, agosto y septiembre se basaron en los promedios mensuales de las variables climáticas utilizadas, se obtuvieron mediante la siguiente expresión.

$$\bar{vc} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n vc_i \quad (4)$$

Donde: \bar{vc} es el promedio mensual de la variable climática, n el número de días del mes (30 o 31 días) según corresponda y vc_i valor diario de las variables climáticas.

Se obtuvieron 12 datos por año, de un total de 32 años (1988-2019): T_{max_Jul} , T_{max_Ago} , T_{max_Sep} , T_{min_Jul} , T_{min_Ago} , T_{min_Sep} , Pp_Jul , Pp_Ago , Pp_Sep , Eva_Jul ,

Eva_Ago , Eva_Sep . También, se obtuvo el valor máximo de la T_{max} (TT_{max}) y el valor mínimo de T_{min} (TT_{min}), la precipitación total (SPp) y la evaporación total ($SEva$) del ciclo de producción, dando un total de 16 variables climáticas por año.

La información sobre rendimiento de frijol de temporal (Rto ; $t \text{ ha}^{-1}$), superficie sembrada (SS ; miles, ha), superficie cosechada (SC ; miles ha) y producción (P ; t), se obtuvo del Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (SIAP, 2019) para los años 1988-2019, entidad federativa: Zacatecas, cultivo: frijol, ciclo: perenes y modalidad: temporal, obtenidos de los promedios anuales de las variedades y localidades del estado de Zacatecas.

Con el fin de conocer la fuerza de la relación lineal entre las 16 variables climáticas y superficie sembrada consideradas como variables de entrada, contra rendimiento de frijol, superficie cosechada y producción incluidas como variables de salida, se realizó un análisis de correlación (Gogtay y Thette, 2017), previamente al diseño de las RNA's.

DISEÑO Y ENTRENAMIENTO DE LA RED

Se implementaron tres redes neuronales artificiales (RNA) con una estructura perceptrón multicapa. Con 16 variables climáticas y la superficie de siembra como las entradas y como variables de salida rendimiento de frijol, superficie cosechada y producción. El número de neuronas en la capa oculta (h) se varió utilizado como referencia los criterios: $h = \sqrt{mn}$, como límite inferior y $h = 2n + 1$ del teorema de Kolmogorov (Kolmogorov, 1957) como límite superior, en donde: n es número de entradas y m es el número de salidas. Las variables de entrada para cada una de las redes se seleccionaron con base a los resultados del análisis de correlación y un estudio exploratorio, combinando las variables de entrada y número de neuronas en la capa oculta. Se utilizó el 95 % de los datos (1988-2017) para el entrenamiento, validación y prueba con 50, 25 y 25 % de los datos respectivamente y el 5 % restante (2018-2019) para la evaluación. El algoritmo de aprendizaje utilizado fue gradiente descendiente con momentum (Garg *et al.*, 2016; Mohamed, 2019) y algoritmo de entrenamiento fue Levenberg-Marquardt backpropagation (LM) (Marquardt, 1963). Para generar los modelos de RNA se realizó un análisis exploratorio combinando las diferentes variables de entrada y número de neuronas en capa oculta hasta alcanzar un buen desempeño.

Todas las RNA se implementaron en MATLAB® con el Toolbox de "Neural Networks" (Demuth *et al.*, 2017; Moore, 2012). La función "newff" se utilizó para crear, entrenar y validar la red, el número de entradas y neuronas en la capa oculta se eligió con base al análisis exploratorio para cada modelo RNA. Se obtuvo el conjunto de pesos óptimos que minimizan el error de acuerdo con la metodología descrita por Chatterjee *et al.* (2018).

MEDIDAS DE DESEMPEÑO

Para medir el desempeño de la RNA se calcularon: 1) el coeficiente de determinación (R^2), (Ecuación 5), (Demuth *et al.*, 2017; Pecar y Davis, 2018), 2) el error medio absoluto (MAE ;

Ecuación 6), 3) el error cuadrado medio (*MSE*; Ecuación 7); 4) la raíz cuadrada del error cuadrado medio (*RMSE*; Ecuación 8), (Heng *et al.*, 2009), y 5) la eficiencia propuesta por Nash y Sutcliffe (*E*; Ecuación 9) que caracteriza el comportamiento del modelo de simulación, el modelo perfecto debería tener una eficiencia cercana a 1 (Krause *et al.*, 2005).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (5)$$

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i|}{n} \quad (6)$$

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (7)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (8)$$

$$E = 1 - \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (9)$$

Donde: y_i representa el valor observado, \hat{y}_i el valor predicho de la red, \bar{y} es el promedio de los valores observados y n el número de datos.

Análisis de sensibilidad

Con el fin de identificar las variables más importantes para predecir la salida, se implementó el método de Garson, que utiliza la matriz de pesos entre la capa de entrada y oculta, y entre la oculta y la capa de salida, se discrimina la importancia relativa de las variables predictoras para una sola variable de respuesta. La contribución relativa de cada entrada (RI_j) está dada por la Ecuación 10 (García *et al.*, 2020).

$$RI_j = \frac{\sum_{j=1}^n \left[\frac{|W_{ij} \cdot W_{jo}|}{\sum_{k=1}^m |W_{ij} \cdot W_{jo}|} \right]}{\sum_{k=1}^m \left[\sum_{j=1}^n \left[\frac{|W_{ij} \cdot W_{jo}|}{\sum_{k=1}^m |W_{ij} \cdot W_{jo}|} \right] \right]} \cdot 100 \quad (10)$$

Donde: W_{ij} -pesos sinápticos de la conexión de entrada i a la capa oculta, W_{jo} -pesos sinápticos de la conexión capa oculta j a la salida, m - número de neuronas en la capa oculta y n - número de capas ocultas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Datos faltantes

Las variables climáticas diarias de la estación (32021) González Ortega, tuvieron 3.8 % de datos faltantes para precipitación, temperatura máxima y mínima y 2.2 % de datos faltantes para evaporación (Figura 1). Dado que los datos existentes están por arriba del 80 % que recomienda la organización meteorológica mundial (WMO, 2011), se construyeron series completas a partir de cada subperiodo homogéneo, utilizando "CLIMATOL 3.1.1" (Guijarro, 2018).

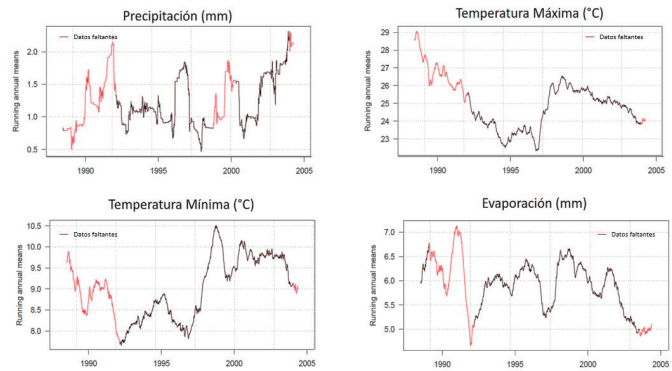


Figura 1. Estimación de datos faltantes de la Estación No. 32021 (1988 a 2005).

Figure 1. Estimation of missing data for Station No. 32021 (1988 to 2005).

Correlación de las variables de entrada y salida

Se consideraron las variables correlacionadas significativamente ($p < 0.05$), es decir variables con coeficientes absolutos mayores a 0.35 para ser utilizadas en los modelos de RNA para la predicción del Rendimiento (Rto), Superficie Cosechada (SC) y Producción (P). En Rto se observaron correlaciones positivas de 0.38, 0.44, 0.36, 0.62, 0.38, y 0.46 para Pp_Jul, Pp_Ago, Pp_Sep, SPp, Tmin_Jul, TTmin respectivamente y correlaciones negativas con valores -0.49 y -0.58 para Tmax_Sep y TTmax. Gourdji *et al.* (2015) en un trabajo sobre rendimiento de frijol y maíz en Nicaragua con datos históricos del clima encontraron una alta correlación entre rendimiento de frijol con la temperatura y precipitación. Wilson *et al.* (1995) mencionan que el rendimiento de los cultivos está afectado por precipitación, radiación solar y temperatura principalmente. Qian *et al.* (2006) obtuvo una correlación de 0.57 entre la radiación solar y evaporación con datos 1955-2000 en China. Por lo que se incluyó como entrada la SEva para generar el modelo RNA de Rto.

Para SC se observó una correlación negativa de -0.40, -0.59 y -0.55 para Eva_Ago, Eva_Sep y SEva y una alta correlación positiva de 0.71 con SS. Para P los valores absolutos fluctuaron entre 0.35, 0.36, 0.49, -0.40 -0.47 -0.42, -0.46, -0.5 y 0.39 para Pp_Ago, Pp_Sep, SPp, Tmax_Sep, Tmin_Jul, Eva_Jul, Eva_Sep, SEva y SS, respectivamente.

Con base en los resultados de correlación y el estudio exploratorio se definieron las variables de entrada de la siguiente manera: RTo → [Pp_Jul, Pp_Ago, Pp_Sep, TTmax, TTmin, SEva], SC → [SEva, SS] y P → [Pp_Jul, Pp_Ago, Pp_Sep, TTmax, TTmin, SEva, SS].

Modelos de Redes Neuronales Artificiales

RNA para predicción del rendimiento

Para el modelo de RNA rendimiento se utilizaron: Pp_Jul, Pp_Ago, Pp_Sep, TTmax, TTmin, SEva como variables de entradas y 13 neuronas en la capa oculta (Figura 2). La eficiencia fue de 0.74, la cual es un valor aceptable (> 0.73) de acuerdo con Demuth *et al.* (2017) y Pecar y Davis (2018). El conjunto de pesos óptimo que minimiza el error cuadrado medio, se obtuvo a las cinco iteraciones.

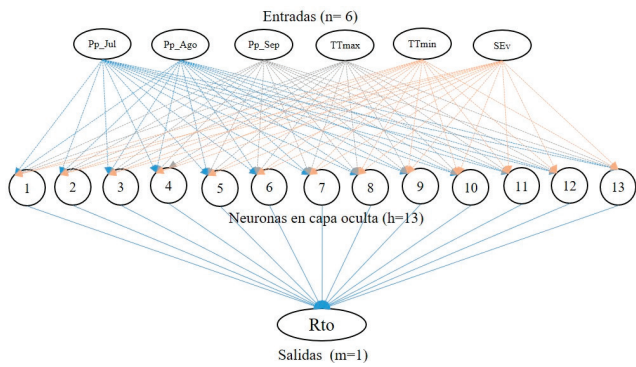


Figura 2. Arquitectura de la Red Neuronal Artificial para predecir rendimiento.

Figure 2. Artificial Neural Network architecture to predict bean yield.

En la Figura 3 se muestra una comparación entre el rendimiento de frijol observado y estimado por la red neuronal para la etapa de entrenamiento, validación y prueba (1988-2017) y evaluación (2018-2019). En la etapa de evaluación se obtuvo una eficiencia de 0.98 lo que significa que el modelo tiene una buena capacidad de simulación y predicción (Abraham *et al.*, 2020). La eficiencia global considerando la etapa de entrenamiento, validación y prueba y evaluación fue de 86 %.

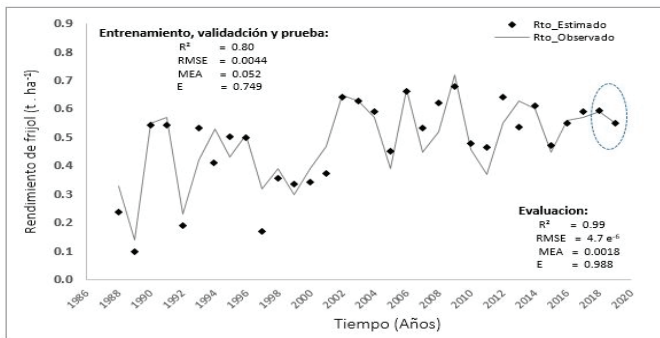


Figura 3. Rendimiento de frijol observado y predicho en la etapa de entrenamiento, validación, prueba y evaluación (círculo punteado) de la RNA.

Figure 3. Observed and predicted bean yield in the training, validation, testing and evaluation stage (dotted circle) of the ANN.

RNA para predicción de la superficie cosechada

En el modelo de RNA para la predicción de superficie cosechada se utilizaron 2 entradas (SEva, SS) y se varió el número de neuronas en la capa oculta (h) hasta obtener la máxima eficiencia con h=10, mostrando una eficiencia global de 0.85.

La eficiencia en la etapa de evaluación fue de 0.98, lo que significa que el modelo tiene una buena capacidad de simulación y predicción. La Figura 4 despliega el desempeño de la red para la variable de superficie cosechada del cultivo de frijol, la eficiencia global fue de 0.85 para las etapas de entrenamiento y evaluación. Un poco inferior a la presentada por Abraham *et al.* (2020) que utilizó redes autorregresivas no lineales con entrada externa-NARX para predecir rendimiento y superficie cosechada del cultivo de soja en Brasil.

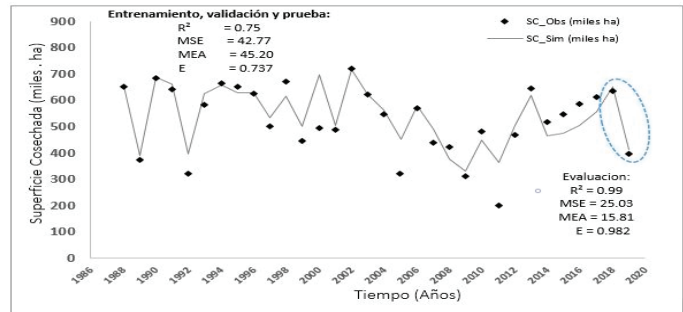


Figura 4. Superficie cosechada, observada y estimada para las etapas de entrenamiento, validación, prueba y evaluación (círculo punteado) de la RNA.

Figure 4. Harvested area, observed and estimated for the training, validation, testing and evaluation stages (dotted circle) of the ANN.

RNA para predicción de la producción

Para la producción de grano de frijol (Figura 5) se utilizaron: Pp_Jul, Pp_Ago, Pp_Sep, TTmax, TTmin, SEva, SS como variables de entrada y 15 neuronas en la capa oculta. La eficiencia encontrada fue de 0.64, en la etapa de entrenamiento, validación y prueba y en la etapa de evaluación la eficiencia fue de 0.65, valor menor a los aceptables (Demuth *et al.*, 2017; Pecar y Davis, 2018). El conjunto de pesos óptimo que minimiza el error cuadrado medio se obtuvo a las seis iteraciones. Debido al bajo desempeño de esta red la producción de frijol se estimó con las predicciones de superficie cosechada y rendimiento obtenidos con los modelos de RNA y se compararon con los datos obtenidos del SIAP (2019). La Figura 5 muestra la producción de 1988 a 2019 en miles de toneladas. Los coeficientes de correlación para la variable de producción fueron de 0.82 y 0.82 para rendimiento y superficie cosechada respectivamente.

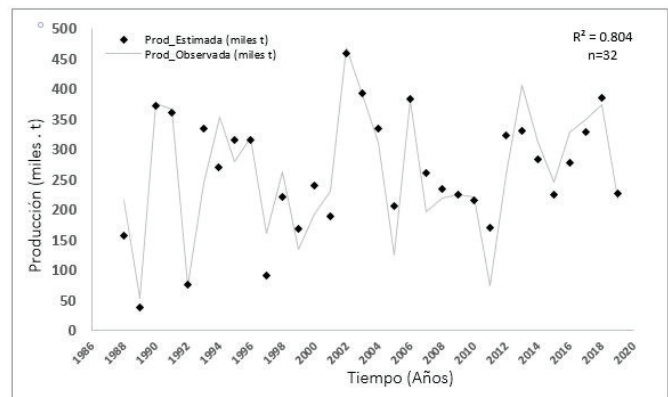


Figura 5. Producción de frijol estimada y observada en miles de toneladas para 32 años en el estado de Zacatecas.

Figure 5. Estimated and observed bean production in thousands of tons for 32 years in the state of Zacatecas.

Al estimar la producción con los modelos RNA se obtiene un R² = 80 %, y puede ser utilizada para simular la producción de frijol en el estado de Zacatecas con datos climáticos y superficie sembrada. Para las tres variables de salida simuladas, se observa un comportamiento estocástico

a través del tiempo al igual que las variables climáticas. Tal como lo afirma Geysler y Van (2001) acerca de la relación positiva entre la precipitación y la productividad de maíz. Otros trabajos citados por Gaytán *et al.* (2014) verifican el riesgo del clima en la producción de cultivos agrícolas para la cobertura de los seguros. De acuerdo con las medidas de desempeño de los modelos de RNA, el modelo para Rto es el que predice mejor en ambas etapas (entrenamiento, validación y prueba y evaluación).

Análisis de sensibilidad

La importancia de las variables predictoras para los modelos obtenidos se muestra en la Figura 6. En el modelo de RNA para simular el rendimiento de frijol, la variable más importante fue la sumatoria de la evaporación (SEva) del ciclo de producción seguida de la precipitación de agosto (Pp_Ago) y julio (Pp_Jul) con una importancia relativa de 21.59 %, 17.64 % y 17.41 % respectivamente. La variable con la mayor importancia relativa en la simulación de la superficie cosechada fue la superficie sembrada (SS) con un valor de 50.11 %, mientras que en el modelo de RNA para estimar la producción las variables más importantes fueron temperatura mínima del ciclo de producción (TTmin) y precipitación de agosto (Pp_Ago) con importancia relativa de 20.60 % y 20.21 %, respectivamente.

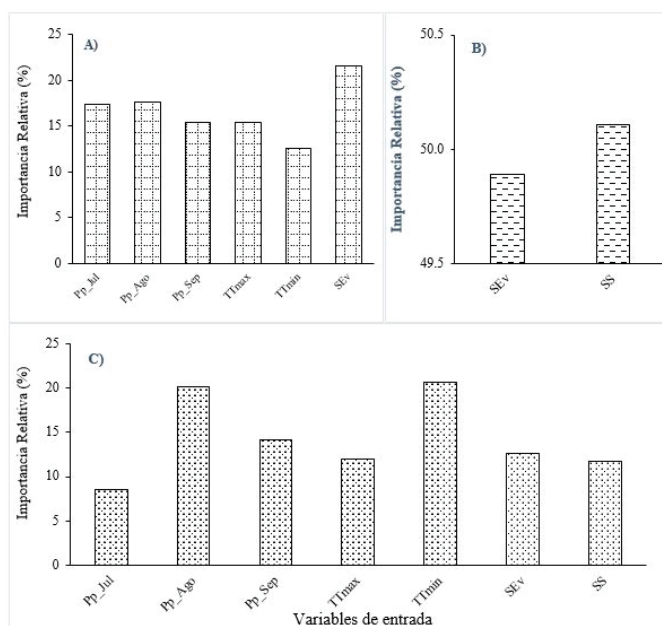


Figura 6. Análisis de sensibilidad para A) Rendimiento, B) Superficie cosechada y C) Producción de los modelos RNA para el cultivo de frijol en Zacatecas.

Figure 6. Sensitivity analysis for A) Yield, B) Harvested area and C) Production of RNA models for bean cultivation in Zacatecas.

Para los modelos de RTo y P la variable de mayor importancia fue la precipitación de agosto, cuando el cultivo está en la etapa de floración, esto coincide con lo reportado por Prieto *et al.* (2019) quienes hicieron un estudio del impacto del clima sobre el rendimiento de frijol en México y concluyeron que el agua es el factor limitante sobre todo en la etapa de floración.

CONCLUSIONES

Los modelos de redes neuronales artificiales generados para predicción de la superficie cosechada y rendimiento de frijol, utilizando variables climáticas y superficie de siembra, mostraron buen desempeño en la etapa de entrenamiento, validación y prueba para un conjunto de 32 años de datos, aunque se debe tener especial cuidado con las fuentes de información y contar con un mayor volumen de datos para que los modelos sean más confiables especialmente en la etapa de evaluación.

Los modelos de RNA generados podrán utilizarse con escenarios futuros de clima artificial para estimar la disponibilidad de grano y evaluación de riegos en los sistemas de producción.

La temperatura mínima del ciclo de producción y la precipitación observada en el mes de agosto, son las variables climatológicas con mayor influencia en la producción de frijol, el comportamiento de dichas variables puede ser un indicador para los productores acerca de la producción esperada. Mientras que la sumatoria de evaporación del ciclo de producción (SEva), fue la variable más importante en la predicción del rendimiento.

REFERENCIAS

- Abraham, E. R., Mendes dos Reis, J. G., Vendrametto, O., Oliveira Costa Neto, P. L. D., Carlo Tolo, R., Souza, A. E. D., y Oliveira Moraes, M. D. 2020. Time Series Prediction with Artificial Neural Networks: An Analysis Using Brazilian Soybean Production. *Agriculture*, 10(10), 475. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100475>
- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D. y Smith, M. 2006. Evapotranspiración del cultivo: guía para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. Estudio FAO Riego y Drenaje. FAO, Roma. 2006. 56-323 pp.
- Chatterjee, S., Dey, N., Sen, S. 2018. Soil moisture quantity prediction using optimized neural supported model for sustainable agricultural applications. *Sustain. Comput. Inform. Syst.* 100279. <https://doi.org/10.1016/j.suscom.2018.09.002>
- Crane, D. A. 2018. Machine learning methods for crop yield prediction and climate change impact assessment in agriculture. *Environmental Research Letters*, 13(11), 114003.
- Demuth, H., Beale, M., Hagan, M. 2017. *Neural Network Toolbox User's Guide*; The MathWorks, Inc.: Natick, MA, USA, <http://www.mathworks.com/help/nnet/ug/dividedata-for-optimal-neural-network-training.html> (last review Mayo 2020)
- Esquivel, A. G., Sánchez, C. I., López, S. A., Velásquez, V. M. A., y Bueno, H. P. 2016. Enfoque metodológico para cuantificar el efecto del cambio en patrones de clima sobre el rendimiento del cultivo de frijol en el estado de Durango. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 15(1), 17-28. <https://doi.org/10.5154/r.rchsa.2015.08.011>
- Fausett, L. V. 2006. *Fundamentals of neural networks: architectures, algorithms and applications*. Pearson Education India.
- Galindo, G. G. y Zandate, H. R. 2006. Adopción de variedades de frijol en el noroeste de zacatecas. *Terra Latinoamericana*, 24(1), 141-147.

- García, M. H.; Flores, M. H.; Ascencio, H., R.; Khalil, G. A.; Tijerina, C., L.; Mancilla, V. O.R.; Vázquez, P. M.A. 2020. Corn Grain Yield Estimation from Vegetation Indices, Canopy Cover, Plant Density, and a Neural Network Using Multispectral and RGB Images Acquired with Unmanned Aerial Vehicles. *Agriculture*, 10, 277. <https://doi.org/10.3390/agriculture10070277>
- Garg, B., Kirar, N.; Menon, S., Sah, T. 2016. A performance comparison of different back propagation neural networks methods for forecasting wheat production. *CSI Trans. ICT*, 4, 305–311. <https://doi.org/10.1007/s40012-016-0096-x>
- Gaytán, J. C. T., Acevedo, M. E. S., y Arias, J. Á. R. 2014. Modelación del clima bajo un proceso estocástico de reversión a la media estacional. *Estocástica: finanzas y riesgo*, 4(1), 9-32.
- Geyser, J. M., and van de Venter, T.W.G. 2001. "Hedging Maize Yield with Weather Derivatives". Working Paper 2001-13, University of Pretoria, Department of Agricultural Economics, Extension and Rural Development, 1-19 <http://purl.umn.edu/18067>
- Gogtay, N. J. y Thatte, U. M. 2017. Principles of correlation analysis. *Journal of the Association of Physicians of India*, 65(3), 78-81. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29313581/>
- Gourdji, S., Läderach, P., Valle, A. M., Martínez, C. Z. y Lobell, D. B. 2015. Historical climate trends, deforestation, and maize and bean yields in Nicaragua. *Agricultural and Forest Meteorology*, 200, 270-281. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2014.10.002>
- Guijarro, J.A. 2002. Tendencias de la precipitación en el litoral mediterráneo español. In *El Agua y el Clima*, Guijarro JA, Grimalt M, Laita M, Alonso S (ed). Asociación Española de Climatología: Palma de Mallorca; 237-246. <http://hdl.handle.net/20.500.11765/9143>
- Guijarro, J.A. 2018. Homogeneización de series climáticas con Climatol. Agencia Estatal de Meteorología (AEMET), DT en Islas Baleares, España. Versión, 3(1).
- Grageda, J. G., Lagunes, A. J., Rodríguez, J. C., Castillo, A. A. F., Chaparro, B. P., & Barrón, R. (2012). Uso de la información de una red de estaciones meteorológicas automatizadas en Sonora. *Biotecnia*, 14(1), 13-17. <https://doi.org/10.18633/bt.v14i1.115>
- Hagan, M.T., Demuth, H.B., Beale, M.H., 1996. *Neural Network Design*. PWS Publishing, Boston, MA.
- Heng, L. K., T. Hsiao, S. Evett, T. Howell, and P. Steduto. 2009. Validating the FAO AquaCrop model for irrigated and water deficient field maize. *Agron. J.* 101(3): 488-498. <https://doi.org/10.2134/agronj2008.0029xs>.
- Intell, K. 2013. Special Issue on Artificial Intelligence in Agriculture. 78, Berlin. Springer-Verlag, 2013, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 43, pp 309-311. 0933-1875.
- Irigoyen, A. I., Della-Maggiara, A., & Angelocci, L. R. 2012. Análisis de los pesos sinápticos en redes neuronales artificiales entrenadas para estimar la lámina de agua en el suelo. XVII Congreso Brasileiro de MeteorologiaAt: Gramado, Brazil Volume: 1 September
- Khan, T., Qiu, J., Ali Qureshi, M.A., Iqbal, M.S., Mehmood, R., Hussain, W. 2020. Agricultural Fruit Prediction Using Deep Neural Networks. *Procedia Comput. Sci.* 174, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2020.06.058>
- Kolmogorov, A. N. 1957. On the representations of continuous functions of many variables by superpositions of continuous functions of one variable and addition. *Dokl. Akad. Nauk USSR* 114: 953 – 956. <http://mi.mathnet.ru/eng/dan/v114/i5/p953>
- Krause, P., D. P. Boyle, and F. Bäse. 2005. Comparison of different efficiency criteria for hydrological model assessment. *Adv. Geosci.* 5: 89-97. <https://doi.org/10.5194/adgeo-5-89-2005>
- Maimaitijiang, M., Sagan, V., Sidike, P., Hartling, S., Esposito, F., Fritschi, F.B. 2020. Soybean yield prediction from UAV using multimodal data fusion and deep learning. *Remote Sens. Environ.* 237, 111599. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111599>
- Marquardt, D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *SIAM Journal of Applied Mathematics*, 11(2): 431–441. <https://doi.org/10.1137/0111030>
- Medina, G., G., Rumayor, R. A. F., Cabañas, C. B., Luna, F. M.; Ruiz, C. J. A., Gallegos, V. C.; Madero, T. J., Gutiérrez, S., J. R.; Rubio, D. S. y Bravo, L. A. G. 2003. Potencial productivo de especies agrícolas en el estado de Zacatecas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Norte Centro. Calera de V. R., Zacatecas, México. (Libro Técnico Núm. 2). 15 7 p.
- Medina, G. G. y Ruiz, C. J. A. 2004. Estadísticas climatológicas básicas del estado de Zacatecas (Periodo 1961-2003). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental Zacatecas. Calera de VR Zacatecas. (Libro Técnico No. 3).
- Medina, G. G., Báez, G. A. D. y Ramos, G. J. L. 2007. Red de monitoreo agroclimático del estado de Zacatecas. INIFAP, Campo Experimental Zacatecas, México. Desplegable informativa Núm. 15. 14 p. consultado mayo 2020 <http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/historico.php?id=26786>
- Mohamed, Z.E. 2019. Using the artificial neural networks for prediction and validating solar radiation. *J. Egypt. Math. Soc.* 27, 47. <https://doi.org/10.1186/s42787-019-0043-8>
- Moore, H. 2012. *MATLAB®. MATLAB for Engineers, Third Edition*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education, Inc, 1-8.
- Stacey N., Friederike M., Hannes E., Naomi S. 2015. Economics of Land Degradation Initiative: Report for policy and decision makers_ Reaping economic and environmental benefits from sustainable land management. Bonn, Germany: ELD Initiative and Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH. <https://hdl.handle.net/20.500.11766/4881>
- Osuna, C. E. S., Figueroa, S. B., Martínez, G. M. Á., y Pimentel, L. J. 2019. Un sistema agroforestal de secano para el altiplano semiárido de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(SPE22), 89-103. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1861>
- Paulhus J. L. H, Kohler, M. A. 1952. Interpolation of missing precipitation records. *Month. Weath. Rev.*, 80:129-133. [https://doi.org/10.1175/1520-0493\(1952\)080<0129:OMPR>2.0.CO2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1952)080<0129:OMPR>2.0.CO2)
- Pecar, B., Davis, G. 2018. *Time Series Based Predictive Analytics Modelling: Using MS Excel*, 3rd ed.; Amazon Kindle: Seattle, WA, USA.
- Prieto, C. M. R., Matus, G. J. A., Gavi, R. F., Omaña, S. J. M., Brambila, P.J. J., Sánchez, E. J. y Martínez, D. M. A. 2019. Evolución de la superficie cultivada de frijol e impacto económico de la sequía sobre su rendimiento bajo condiciones de temporal en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42:173-23 *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 43 (1) 2020 182, <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.2.173-182>

- Qian, Y., Kaiser, D. P., Leung, L. R. y Xu, M. 2006. More frequent cloud-free sky and less surface solar radiation in China from 1955 to 2000. *Geophysical Research Letters*, 33(1). <https://doi.org/10.1029/2005GL024586>
- Raghuwanshi, N. S. y Wallender, W. W. 1998. Converting from pan evaporation to evapotranspiration. *Journal of irrigation and drainage engineering*, 124(5), 275-277.
- Ruiz-Del-Angel, E. O., Castilleja, R. D. C. V., Aguilar, J. C. R., & García, C. A. C. 2019. Modelo de requerimiento hídrico en un distrito de riego en México: incorporando escenarios de cambio climático. *Biotecnica*, 21(2), 129-136. <https://doi.org/10.18633/biotecnica.v21i2.946>
- Saltelli, A. (2002). Sensitivity analysis for importance assessment. *Risk analysis*, 22(3), 579-590. <https://doi.org/10.1111/0272-4332.00040>
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). 2010. Mapa de climatología 1981-2010. <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/informacionclimatologica/informacion-estadistica-climatologica>
- SIAP. 2019. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera Información Agrícola. Avances mensuales por estado. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>.
- Silva M. G. 1998. Hidrología básica. Bogotá: Publicaciones Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional.
- Trethowan, R. M., Turner, M. A. y Chattha, T. M. 2010. Breeding strategies to adapt crops to a changing climate. In: Lobell, D. & Burke, M. (eds.), *Climate change and food security, advances in global change research*, 37, 175 - 154 https://doi.org/10.1007/978-90-481-2953-9_9
- Wilson, D. R.; Muchow, R. C. and Murgatoid, C. J. 1995. Model analysis of temperature and solar radiation limitations to maize potential productivity in cool climate. *Field Crops Res.* 43:1-18. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(95\)00037-Q](https://doi.org/10.1016/0378-4290(95)00037-Q)
- WMO. 2011. Guide to climatological practices. No. 100 https://www.wmo.int/pages/prog/wcp/ccl/guide/documents/WMO_100_en.pdf

Concentración y método de aplicación de selenio en plántulas de pimiento

Concentration and application method of selenium in pepper seedlings

González-Chávez O¹, Alejo-Santiago G², Bugarín-Montoya R², Juárez-Rosete CR^{2*}, Arrieta-Ramos BG², Juárez-López P³

¹ Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. Km 9, Carretera Tepic-Compostela, Xalisco, Nayarit, México.

² Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Km 9, Carretera Tepic-Compostela, Xalisco, Nayarit, México.

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001 Col. Chamilpa, CP 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

RESUMEN

El selenio (Se) es considerado un elemento benéfico para las plantas; sin embargo, concentraciones elevadas pueden causar trastornos fisiológicos y morfológicos. El objetivo del estudio, fue identificar la concentración y método de aplicación de Se que permita la obtención de plántulas de calidad en cultivo de pimiento, por ello, se establecieron dos experimentos bajo condiciones de invernadero cultivados en solución nutritiva. En el experimento 1, para aplicación radical, se cultivaron plántulas en solución nutritiva enriquecida con Se en forma de Na_3SeO_4 en concentraciones de: 0.0, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 μM . En el experimento 2, para aplicación foliar, las plántulas se asperjaron con Se en forma de Na_3SeO_4 en concentraciones de 0, 5, 10, 25 y 50 μM . En cada experimento se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. El suministro de 1 y 5 μM de Se mediante aplicación radical y foliar respectivamente, estimularon el crecimiento de las plántulas de pimiento, asimismo, la presencia de Se en ambos métodos de aplicación, aumentó la concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas. El Se mejoró la calidad de las plántulas, al inducir respuestas favorables en el crecimiento y concentración de pigmentos fotosintéticos.

Palabras clave: selenito de sodio; raíz; foliar; cultivo sin suelo.

ABSTRACT

Selenium (Se) is considered a beneficial element for plants; however, high concentrations can cause physiological and morphological disorders. The objective of the study was to identify the Se concentration and application method that allow obtaining quality seedlings in pepper cultivation, therefore, two experiments were established under greenhouse conditions cultivated in nutrient solution. In experiment 1, for root application, seedlings were grown in a nutrient solution enriched with Se in the form of Na_3SeO_4 at concentrations of: 0.0, 1.0, 2.5, 5.0 and 10.0 μM . In experiment 2, for foliar application, the seedlings were sprayed with Se in the form of Na_3SeO_4 at concentrations of 0, 5, 10, 25 and 50 μM . In each experiment, a completely randomized experimental design with five replications per treatment was used. The supply of 1 and 5 μM of Se through root and foliar application, respec-

tively, stimulated the growth of pepper seedlings, similarly, the presence of Se in both application methods increased the concentration of photosynthetic pigments in leaves. Se improved seedling quality by inducing favorable responses in growth and concentration of photosynthetic pigments.

Keywords: sodium selenite; root; foliar; soilless culture.

INTRODUCCIÓN

El uso de plántulas producidas en contenedores está aumentando como resultado de la creciente demanda de hortalizas en el mercado (Wang *et al.*, 2021). Los principales criterios morfológicos utilizados para describir la calidad de plántulas son: altura, crecimiento radical, diámetro de tallo, área foliar y acumulación de biomasa seca (Qin y Leskovar, 2020; Mendivil-Lugo *et al.*, 2020). Plántulas de baja calidad suelen ser el factor limitante del potencial de rendimiento de un cultivo (Simkin *et al.*, 2019); sin embargo, si la calidad es alta, tienen mayor tasa de supervivencia, mejor desarrollo en campo y uso eficiente de recursos, lo que eventualmente se traduce en mayor rendimiento y rentabilidad para los agricultores (Geshnizjani *et al.*, 2019).

Uno de los principales factores que influyen en la calidad de las plántulas es la composición de la solución nutritiva (Reyes-Pérez *et al.*, 2020). Elementos como silicio, lantano, vanadio y selenio se utilizan en la preparación de soluciones nutritivas como bioestimulantes en la producción de plántulas, debido que promueven el crecimiento y desarrollo, sin embargo, la información es escasa, por lo que es conveniente realizar más investigación para dilucidar la correcta aplicación y concentración de estos elementos (Trejo-Téllez *et al.*, 2020).

El Se es un elemento benéfico para las plantas en concentraciones bajas. Los beneficios fisiológicos que brinda son mayor resistencia contra el estrés oxidativo (Galić *et al.*, 2021); tolerancia contra estrés biótico y abiótico (Hasanuzzaman *et al.*, 2020); incremento en la síntesis de pigmentos fotosintéticos y actividad fotosintética (Lanza y Reis, 2021); mayor crecimiento en plantas y rendimiento de los cultivos (Luo *et al.*, 2020). Sin embargo, si las concentraciones de Se son altas, pueden provocar toxicidad debido al cambio de estructura y función de las proteínas, así como inducir estrés oxidativo, lo

que conduce a la alteración de varios procesos metabólicos (Hasanuzzaman *et al.*, 2020).

El efecto benéfico o tóxico de Se dependerá de la concentración y método de aplicación (Yin *et al.*, 2019). Las concentraciones utilizadas mediante aplicación foliar suelen ser mayores, respecto a la vía radical, debido al menor tiempo de contacto y absorción de las soluciones a través de las hojas (Nawaz *et al.*, 2014). Así mismo, el margen entre los niveles benéficos y tóxicos es muy estrecho, y concentraciones fuera de este rango, pueden causar alteraciones en el crecimiento y fisiología de la planta (Dawood *et al.*, 2020).

En el caso de cultivo comercial del pimiento, la fase de plántula es la más crítica y un crecimiento inicial vigoroso, será fundamental para el establecimiento en campo (Qin y Leskovar, 2020); sin embargo, no existe información suficiente sobre el efecto del Se en la producción de plántulas de pimiento, por ello, la generación de nuevo conocimiento técnico y científico acerca de los efectos del Se en el crecimiento de pimiento, permitirá un uso adecuado en la horticultura en función de su concentración y método de aplicación (Wang *et al.*, 2021). En este contexto, el objetivo de esta investigación fue identificar la concentración y método de aplicación de Se que permita la obtención de plántulas de calidad en cultivo de pimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El estudio se realizó bajo condiciones de invernadero, en un sistema de cultivo en solución nutritiva, ubicado en la Unidad Académica de Agricultura, Xalisco estado de Nayarit, durante el periodo del 18 de junio al 16 de agosto del 2021.

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se emplearon semillas de pimiento variedad Prosperity y se germinaron en charolas de poliestireno de 200 cavidades utilizando turba vegetal (Sunshine® #3). A los 21 días posteriores a la emergencia, las plántulas se trasplantaron en placas flotantes de poliestireno en contenedores de 1.7 L con solución nutritiva de Steiner al 50 % modificada de acuerdo a González-Chávez *et al.* (2019) (Tabla 1). Después de un periodo de adaptación de siete días, se establecieron dos experimentos independientes, que consistieron cada uno en 50 plántulas distribuidas en 25 contenedores de 1.7 L y dos plántulas por contenedor, dando inicio con la aplicación de los tratamientos.

Tabla 1. Composición química de la solución nutritiva empleada.

Table 1. Chemical composition of the nutrient solution used.

NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	NH ₄ ⁺	PO	C.E.	pH
meq·L ⁻¹							atm	dS·m ⁻¹	
6.750	0.405	2.840	3.235	4.160	1.850	0.750	-0.360	1 ± 0.1	6.0 ± 0.1

PO: presión osmótica; atm: atmósferas.

Tratamientos

Experimento 1. Aplicación de Se vía radical: las soluciones nutritivas se enriquecieron con Se como Na₂SeO₃ (Sigma-Aldrich) en concentraciones de 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 μM y un testigo sin Se. Las plántulas se cultivaron durante un periodo de 21 días.

Experimento 2. Aplicación de Se vía foliar: las plántulas se asperjaron con agua destilada enriquecida con Se como Na₂SeO₃ (Sigma-Aldrich) en concentraciones de 5, 10, 25 y 50 μM y un testigo sin Se. Las aplicaciones se realizaron a intervalos de 7 días durante un periodo de 21 días.

Las soluciones nutritivas para ambos experimentos se prepararon con agua destilada; se renovó cada siete días y cada 48 h se adicionó la solución perdida por evapotranspiración. La oxigenación de la solución se realizó mediante una bomba de aire ACQ-906 y se activó durante cinco minutos a intervalos de una hora, obteniéndose 4.3 ± 0.2 mg·L⁻¹ de oxígeno disuelto en solución. Se registró dentro del invernadero una temperatura media diaria de 26.53 °C.

Diseño experimental

En ambos experimentos el diseño experimental fue completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento; la unidad experimental consistió en dos plántulas colocadas en un contenedor.

Variables respuesta

Veintiún días después de iniciados los tratamientos, se procedió con la determinación de las variables respuesta. La concentración de pigmentos fotosintéticos, correspondientes a clorofila *a* (Cl_a), *b* (Cl_b), total (Cl_{total}) y carotenoides (C_{x+c}), se realizó mediante la metodología de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Se muestrearon hojas maduras jóvenes y se pesaron 25 mg de tejido foliar fresco provenientes del centro del limbo foliar, sin considerar la nervadura principal; se maceraron en 2 mL de acetona RA J.T. BAKER al 80 %, previamente refrigerada (4 °C). El extracto resultante se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga MC-CENTRIF6°. Se separó el sobrenadante y se ajustó a 2 mL. Se midió la absorbancia a 470, 646 y 663 nm en el espectrofotómetro UV-VIS HE170800°. Las concentraciones se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$Cl_a = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$Cl_b = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$Cl_{total} = (Cl_a + Cl_b)$$

$$C_{x+c} = \frac{[1000 A_{470} - 3.27 (Cl_a) - 104 (Cl_b)]}{229}$$

Para el crecimiento de plántulas se consideró las siguientes variables: altura, se midió desde la base del tallo al ápice de crecimiento; diámetro de tallo, se midió a un cm de la base del tallo con un vernier digital; número de hojas,

se contabilizó la cantidad de hojas desarrolladas; longitud de raíz, se midió desde la base del tallo hasta el ápice de la raíz principal; volumen de raíz, se determinó mediante el desplazamiento del agua al sumergir la raíz dentro de una probeta graduada con volumen de agua conocido; área foliar, se determinó mediante un integrador de área foliar CI-202[®]; biomasa seca total acumulada, las muestras de raíz, hoja y tallos se secaron en una estufa de aire forzado Felisa FE293AD[®] a 70 °C hasta alcanzar peso constante y posteriormente se pesaron en una balanza digital Ek-200i[®].

Análisis estadístico

Para cada experimento, los datos obtenidos de las variables respuesta consideradas en los tratamientos experimentales se sometieron a un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el programa estadístico SAS[®].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables de crecimiento

En el experimento 1, con aplicación de Se vía radical, se observaron diferencias en la mayoría de las variables de crecimiento, excepto altura y número de hojas, mientras que, para el experimento 2, con aplicación foliar de Se, únicamente mostró diferencias para longitud de raíz, área foliar y biomasa seca de tallos y hojas.

Diámetro de tallo. El suministro de Se mediante aplicación radical, no afectó el diámetro de tallo en concentraciones inferiores de 5 μM , mientras que 10 μM causaron reducción en 18.18 % respecto al testigo. No obstante, las distintas concentraciones de Se mediante aplicación foliar, no mostraron diferencias significativas para esta variable (Figura 1).

Esto concuerdan con lo reportado por Sabatino *et al.* (2019) en cultivo de endivia rizada (*Cichorium endivia* L. var. Crispum Hegi), donde el suministro de 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Se mediante aplicación radical, redujo el diámetro de tallo. Ślusarczyk *et al.* (2015) reportaron que el suministro de altas concentraciones de Se aunado a un tiempo prolongado de exposición, pueden causar disminución en la división celular, lo que contribuye a una reducción en el diámetro de tallo.

Longitud de raíz. La longitud de raíz obtuvo el valor más alto con el suministro de 2.5 μM de Se mediante aplicación radical, con un incremento del 22.98 % respecto al testigo. Mientras que, para aplicación foliar, la concentración que favoreció la longitud de raíz fue con 5 μM (Figura 2). Resultados similares reportaron Shekari *et al.* (2016), en cultivo de chile picante (*Capsicum annum* L. cv. Kenya), donde el suministro de 5 μM de Se mediante aplicación radical, aumentó el crecimiento de las raíces. Sin embargo, en cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) la aplicación foliar de 0.5 μM de Se favoreció la longitud de raíz (Lei *et al.*, 2018).

Volumen de raíz. El volumen de raíz aumentó con las concentraciones de Se en aplicación radical hasta 2.5 μM , mientras que concentraciones más altas la disminuyeron.

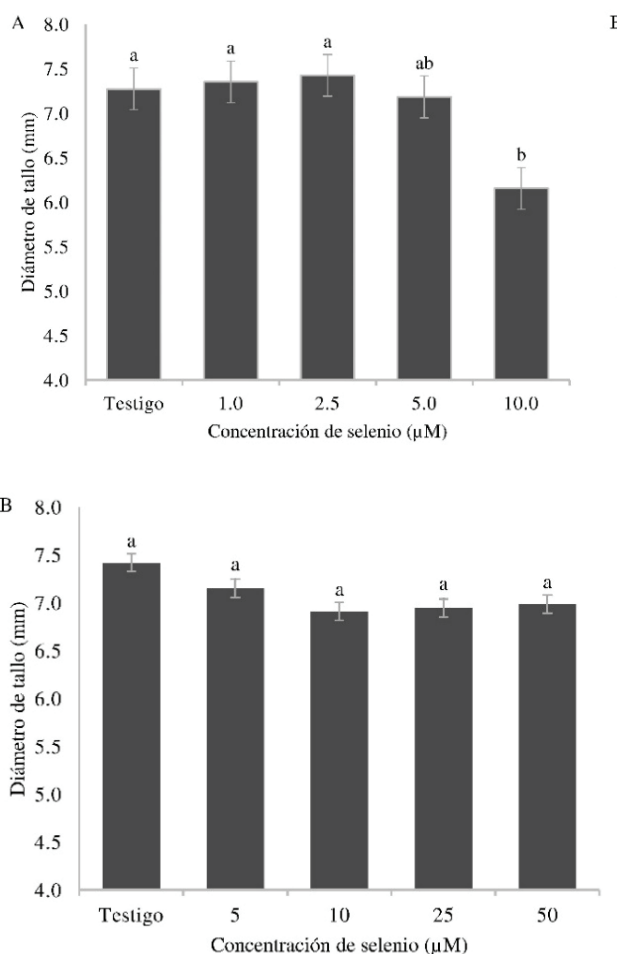


Figura 1. Diámetro de tallo en función del método de aplicación y concentración de selenio. (A) radical; (B) foliar. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 1. Stem diameter as a function of application method and selenium concentration. (A) root; (B) foliar. Means with different letters indicate statistically significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

El volumen de raíz no se modificó por la aplicación foliar de Se (Figura 3). Resultados similares reportaron Mozafariyan *et al.* (2017) en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Foria), donde el suministro de 3 μM de Se mediante aplicación radical aumentó el volumen de raíz. Sun *et al.* (2010) afirmaron que el Se en concentraciones bajas, mejora la meiosis de los meristemos celulares de las raíces, lo que resulta en un aumento de la longitud y volumen de raíz.

Área foliar. El suministro de 1 μM de Se mediante aplicación radical, obtuvo el valor más alto; sin embargo, conforme aumentó la concentración, disminuyó hasta 25.20 %. La aplicación foliar de 5 μM de Se incrementó 13.81 % el área foliar respecto al testigo; mientras que, aplicaciones más altas causaron que disminuyera (Figura 4). Las hojas son muy sensibles a condiciones de estrés, como el provocado por altas concentraciones de Se, lo cual causa disminución en la expansión foliar (Hatamian *et al.*, 2020).

Biomasa seca. Para la acumulación de biomasa seca, el suministro de Se mediante aplicación radical promovió

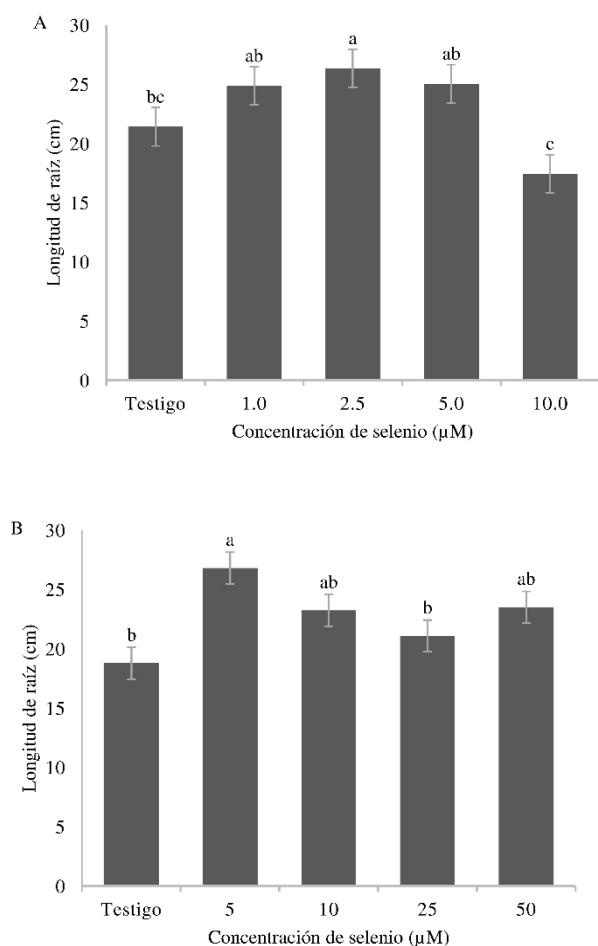


Figura 2. Longitud de raíz en función del método de aplicación y concentración de selenio. (A) radical; (B) foliar. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 2. Root length as a function of application method and selenium concentration. (A) root; (B) foliar. Means with different letters indicate statistically significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

diferencias en todos los órganos estudiados. Los valores más altos se obtuvieron con la concentración de 1.0 μM, con un incremento de 15.44, 16.10 y 27.50 % para raíces, tallos y hojas, respectivamente, comparado con el testigo. Lo que evidenció la mayor acumulación de biomasa seca total (Figura 5).

La estimulación del crecimiento podría deberse a un aumento en el contenido de almidón en los cloroplastos, así como la protección de las membranas celulares contra la peroxidación lipídica (Sun *et al.*, 2010). Además, Borbély *et al.* (2021) mencionaron que la promoción del crecimiento podría deberse al aumento en el nivel y señalización del ácido indol-3-acético, que se incrementa en respuesta al tratamiento con Se.

La aplicación foliar de Se no mostró diferencias para biomasa seca radical y total; sin embargo, sí modificó la biomasa seca en tallos y hojas. La concentración que favoreció la mayor acumulación de biomasa seca para tallo fue 5 μM con aumento del 42.97 % respecto al testigo, mientras que

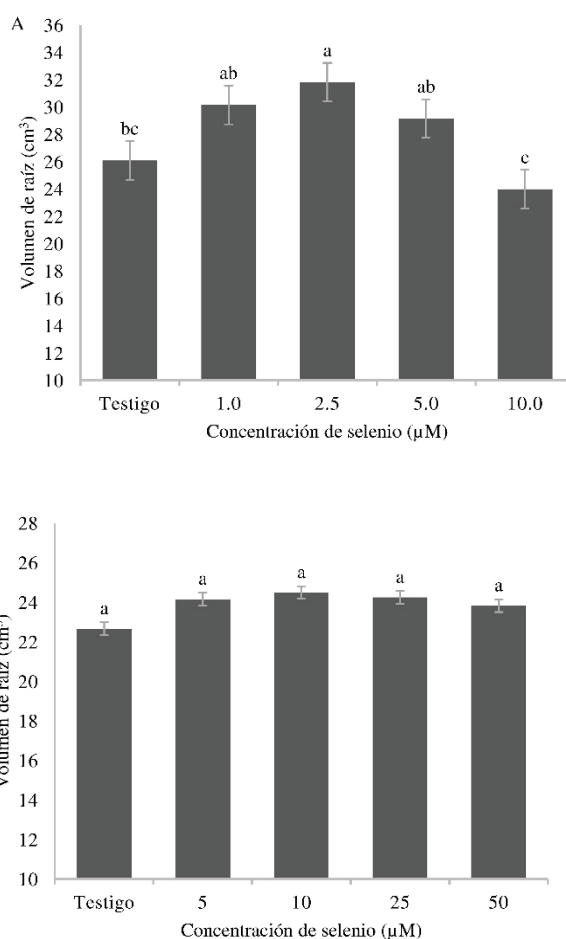


Figura 3. Volumen de raíz en función del método de aplicación y concentración de selenio. (A) radical; (B) foliar. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 3. Root volume as a function of application method and selenium concentration. (A) root; (B) foliar. Means with different letters indicate statistically significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

la mayor acumulación de biomasa seca en hoja se obtuvo con 25 μM (Figura 6). Borbély *et al.* (2021) afirmaron que la aplicación foliar de Se no induce crecimiento general de la planta, sino un cambio de distribución de biomasa, como se observa en los resultados de la presente investigación. La aplicación foliar de Se aumenta la concentración de este elemento en hojas y se redistribuye a los tallos a través del floema, por esta razón, los efectos variables en la biomasa se reflejan mayormente en órganos aéreos comparados con la raíz (Xia *et al.*, 2020).

En general, la mayor respuesta en las variables de estudio se obtuvieron con el suministro de Se mediante aplicación radical comparado con aplicación foliar, esto pudiera deberse a que las gotas generadas por aspersión se evaporan en minutos o segundos después de ser depositadas sobre la superficie de las hojas, reduciendo así el tiempo de contacto y absorción de Se en la planta (Tredenick *et al.*, 2021), mientras que, mediante aplicación a la raíz, el tiempo de contacto y acumulación de Se es mayor (Sabatino *et al.*, 2019).

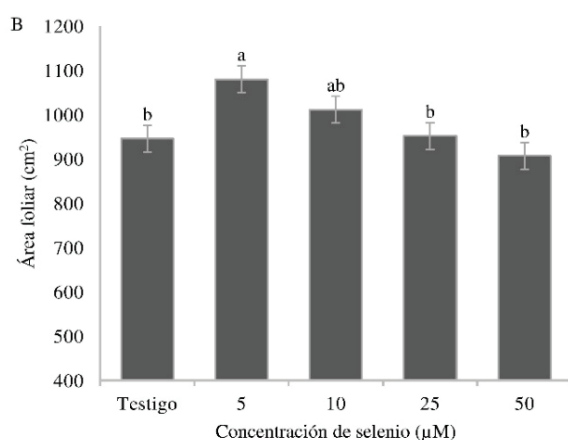
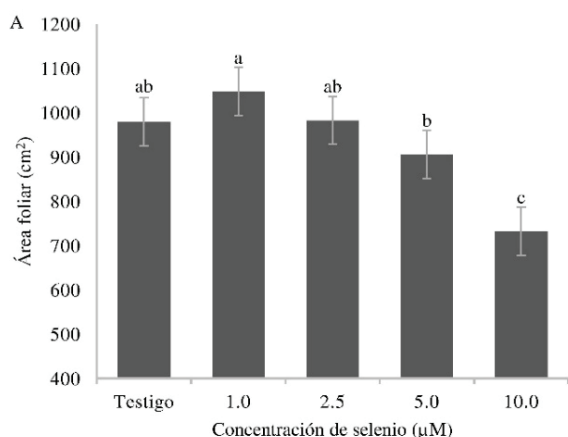


Figura 4. Área foliar en función del método de aplicación y concentración de selenio. (A) radical; (B) foliar. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 4. Leaf area as a function of application method and selenium concentration. (A) root; (B) foliar. Means with different letters indicate statistically significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

El aumento en el crecimiento de las plántulas de pimiento, con las concentraciones bajas de Se mediante ambos métodos de aplicación, sugieren un aumento en el potencial de rendimiento en etapa de producción. Esto es congruente con Qin y Leskovar (2020) en cultivo de pimiento (*Capsicum annum* cv. Hunter) y tomate bola (*Solanum lycopersicum* cv. HM1823) quienes obtuvieron mayores rendimientos cuando se utilizaron plántulas con mayor crecimiento radical y biomasa seca en raíz, tallos y hojas, comparada con aquellas con menor desarrollo. Esto sugiere el potencial del Se para mejorar la calidad de plántulas y rendimiento postrasplante de pimiento.

Pigmentos fotosintéticos

El suministro de 10 µM de Se mediante aplicación radical aumentó la concentración de clorofila *a* y *b* en 11.15 y 21.34 % respectivamente comparadas con el testigo. De igual manera, la mayor concentración de clorofila total, se obtuvo con el suministro de 10 µM. Para la concentración de carotenoides, no hubo diferencia entre los niveles crecientes de Se, pero sí respecto al testigo, el cual aumentó 60.46 %

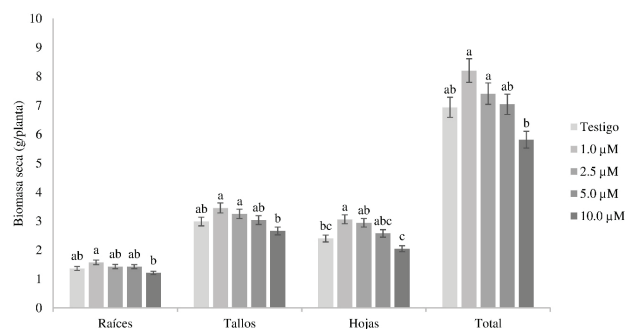


Figura 5. Biomasa seca en función de la concentración de selenio mediante aplicación radical. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 5. Dry biomass as a function of selenium concentration by root application. Means with different letters indicate statistically significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

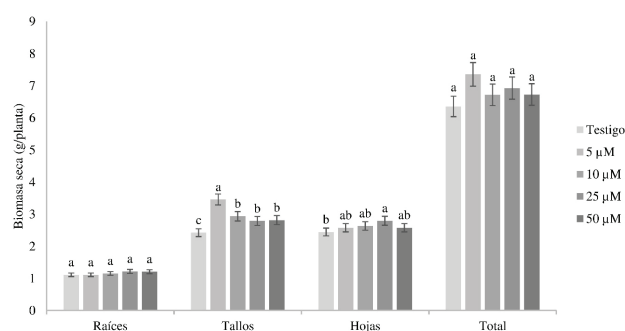


Figura 6. Biomasa seca en función de la concentración de selenio mediante aplicación foliar. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 6. Dry biomass as a function of selenium concentration by foliar application. Means with different letters indicate statistically significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

con 1.0 µM (Figura 7).

De manera similar, Mozafariyan *et al.* (2017) reportaron un aumento en la concentración de clorofila *a*, *b* y total en hojas de plántula de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Foria) con el suministro de 7 µM de Se mediante aplicación radical y aumento en el contenido de carotenoides con 3 µM. Por otra parte, en plántulas de chile picante (*Capsicum annum* L. cv. Kenya), el suministro superior a 5 µM de Se, causaron un decremento en la concentración de clorofilas *a*, *b* y total, mientras que la concentración de carotenoides, no se modificó por la presencia de Se (Shekari *et al.*, 2016).

El aumento en la concentración de pigmentos con la concentración más alta de Se, pudiera deberse al estrés provocado en las células por la disminución en el contenido de agua. Liang *et al.* (2019) reportaron un menor contenido relativo de agua en plántulas de trigo (*Oryza sativa* L.) sometidas a concentraciones altas de Se, lo cual, provoca déficit hídrico en las células y como consecuencia un aumento en el contenido de clorofila debido a la generación de mayor número de tilacoides como mecanismo de defensa (García-Valenzuela *et al.*, 2005).

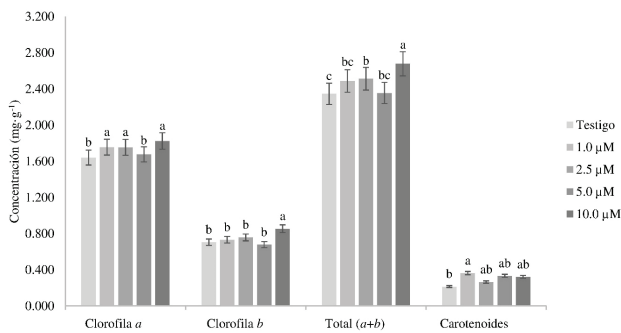


Figura 7. Concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas de plántulas de pimienta en función de la concentración de selenio mediante aplicación radical. Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 7. Photosynthetic pigments concentration in leaves of pepper seedlings as a function of selenium concentration by root application. Means with different letters indicate statistically significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

Para el caso de la aplicación foliar de Se, la concentración de clorofila *a* y *b*, fue mayor con 10 μM , pero disminuyó conforme aumentó la concentración de Se. De igual manera, el mayor valor de clorofila total se obtuvo con la aplicación de 10 μM , mientras que la más baja se obtuvo en el testigo. La concentración de carotenoides obtuvo su valor más alto con la aplicación de 5 μM , superando en 26.44 % al testigo (Figura 8). Resultados similares reportaron Huang *et al.* (2020) en plántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.), donde el contenido de clorofila total aumentó con la aplicación foliar de 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Se.

En general, la concentración de pigmentos fotosintéticos aumentó en presencia de Se en ambos métodos de aplicación, esto pudiera deberse a que el Se actúa como cofactor en reacciones enzimáticas implicadas en la biosíntesis del cloroplasto, lo que provoca un aumento de pigmentos fotosintéticos (Feng *et al.*, 2013). Además, el Se estimula el metabolismo de enzimas responsables de la eliminación de especies reactivas de oxígeno, como superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2020), lo que reduce el daño a los cloroplastos y disminuye la degradación de pigmentos fotosintéticos (Lanza y Reis, 2021).

Las clorofilas son los pigmentos predominantes en el proceso fotosintético; mientras mayor sea su concentración, mayor será la tasa de fijación de CO_2 y, por tanto, mayor será la acumulación de biomasa en la planta (Waraich *et al.*, 2020). No obstante, esto difiere con la presente investigación. La mayor acumulación de clorofilas se obtuvo con la concentración de 10 μM de Se mediante ambos métodos de aplicación, mientras que la mayor acumulación de biomasa se obtuvo con las concentraciones más bajas de Se.

Esto pudiera explicarse debido a que el Se influye en la absorción, distribución y utilización de la energía durante el proceso fotosintético (Borbély *et al.*, 2021). Concentraciones altas de Se causan un aumento en la fluorescencia mínima o inhibición en la fluorescencia máxima, lo que implica una

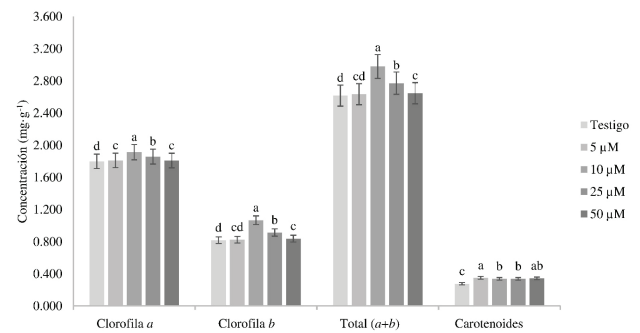


Figura 8. Concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas de plántulas de pimienta en función de la concentración de selenio mediante aplicación foliar. Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 8. Photosynthetic pigments concentration in leaves of pepper seedlings as a function of selenium concentration by foliar application. Means with different letters indicate statistically significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

reducción del rendimiento cuántico del fotosistema II, causando fotoinhibición y por consiguiente la fijación de CO_2 y acumulación de biomasa disminuyen independientemente de la concentración de clorofilas (Kacjan Maršič *et al.*, 2019). Asimismo, las plantas cierran sus estomas como respuesta a condiciones de estrés por altas concentraciones de Se, por tanto, la fijación de CO_2 y generación de biomasa se inhiben a pesar de tener una mayor concentración de pigmentos fotosintéticos (Jiménez-Suanca *et al.*, 2015).

CONCLUSIÓN

El suministro de 1 μM de selenio mediante aplicación radical y 5 μM de selenio mediante aplicación foliar, estimularon el crecimiento en las plántulas de pimienta, no obstante, se observó un efecto negativo en concentraciones más altas. La concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas de pimienta, aumentaron en respuesta a la presencia de selenio mediante ambos métodos de aplicación. Este estudio demuestra que el selenio tiene un uso potencial en la horticultura como bioestimulante, al inducir respuestas favorables en la producción y generación de plántulas de calidad de pimienta.

REFERENCIAS

- Borbély, P., Molnár, Á., Valyon, E., Ördög, A., Horváth-Boros, K., Csupor, D., Fehér, A. y Kolbert, Z. 2021. The effect of foliar selenium (se) treatment on growth, photosynthesis, and oxidative-nitrosative signalling of *Stevia rebaudiana* leaves. *Antioxidants*. 10(1): 72.
- Dawood, M.G., Sadak, M.S., Bakry, B.A. y Kheder, H.H. 2020. Effect of glutathione and/or selenium levels on growth, yield, and some biochemical constituents of some wheat cultivars grown under sandy soil conditions. *Bulletin of the National Research Centre*. 44(1): 1-11.
- Feng, R., Wei, C., y Tu, S. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environmental and experimental botany*. 87: 58-68.

- Galić, L., Vinković, T., Ravnjak, B., y Lončarić, Z. 2021. Agronomic biofortification of significant cereal crops with selenium—A review. *Agronomy*. 11(5): 1015.
- García-Valenzuela, X., García-Moya, E., Rascón-Cruz, Q., Herrera-Estrella, L., y Aguado-Santacruz, G.A. 2005. Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of plant physiology*. 162(6): 650-661.
- Geshnizjani, N., Sarikhani Khorami, S., Willems, L.A., Snoek, B.L., Hillhorst, H.W., y Ligterink, W. 2019. The interaction between genotype and maternal nutritional environments affects tomato seed and seedling quality. *Journal of experimental botany*. 70(10): 2905-2918.
- González-Chávez O., Bugarín-Montoya R., Alejo-Santiago G., y Juárez-Rosete C.R., 2019. Relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ en plantas de pimiento morrón con despunte temprano. *Revista Bio Ciencias*. 6, e548.
- Gutiérrez-Martínez, P.B., Torres-Morán, M.I., Romero-Puertas, M.C., Casas-Solís, J., Zarazúa-Villaseñor, P., Sandoval-Pinto, E., y Ramírez-Hernández, B.C. 2020. Assessment of antioxidant enzymes in leaves and roots of *Phaseolus vulgaris* plants under cadmium stress. *Biotecnia*. 22(2): 110-118.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M., Raza, A., Hawrylak-Nowak, B., Matraszek-Gawron, R., Nahar, K. y Fujita, M. 2020. Selenium toxicity in plants and environment: biogeochemistry and remediation possibilities. *Plants*. 9(12): 1711.
- Hatamian, M., Nejad, A.R., Kafi, M., Souri, M.K. y Shahbazi, K., 2020. Interaction of lead and cadmium on growth and leaf morphophysiological characteristics of European hackberry (*Celtis australis*) seedlings. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 7(1): 1-8.
- Huang, C., Yu, M., Sun, L., Qin, N. y Wei, L., 2020. Physiological responses of sweet potato seedlings under drought-stress conditions with selenium applications. *Journal of Agricultural and Crop Research*. 8(5): 98-112.
- Jiménez-Suancha, S.C., Alvarado, O.H., y Balaguera-López, H.E. 2015. Fluorescence as an indicator of stress in *Helianthus annuus* L. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 9(1): 149-160.
- Kacjan Maršič, N., Golob, A., Šircelj, H., Mihorič, M., Kroflič, A., Stibilj, V., y Germ, M. 2019. Effects of exogenous selenium in different concentrations and forms on selenium accumulation and growth of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*. 21(7): 1905-1917.
- Lanza, M.G.B.D. y Dos Reis, A.R. 2021. Roles of selenium in mineral plant nutrition: ROS scavenging responses against abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 164: 27-43.
- Lei, B., Bian, Z., Yang, Q., Wang, J., Cheng, R., Li, K. y Tong, Y. 2018. The positive function of selenium supplementation on reducing nitrate accumulation in hydroponic lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Integrative Agriculture*. 17(4): 837-846.
- Liang, Y., Su, Y., Li, L., Huang, X., Panhwar, F.H., Zheng, T., y Zhu, J. 2019. Quick selenium accumulation in the selenium-rich rice and its physiological responses in changing selenium environments. *BMC plant biology*. 19(1): 1-11.
- Lichtenthaler, H.K. y A.R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 11: 591-592.
- Luo, H., He, L., Du, B., Pan, S., Mo, Z., Duan, M., Tian, H. y Tang, X. 2020. Biofortification with chelating selenium in fragrant rice: Effects on photosynthetic rates, aroma, grain quality and yield formation. *Field Crops Research*. 255: 107909.
- Mendivil-Lugo, C., Nava-Pérez, E., Armenta-Bojórquez, A.D., Ruelas-Ayala, R.D., y Félix-Herrán, J.A. 2020. Elaboración de un abono orgánico tipo bocashi y su evaluación en la germinación y crecimiento del rábano. *Biotecnia*. 22(1): 17-23.
- Mozafariyan, M., Pessarakli, M. y Saghafi, K. 2017. Effects of selenium on some morphological and physiological traits of tomato plants grown under hydroponic condition. *Journal of Plant Nutrition*. 40(2): 139-144.
- Nawaz, F., Ashraf, M.Y., Ahmad, R., Waraich, E.A., y Shabbir, R.N. (2014). Selenium (Se) regulates seedling growth in wheat under drought stress. *Advances in Chemistry*. 2014, 143567.
- Qin, K., y Leskovar, D.I. 2020. Humic substances improve vegetable seedling quality and post-transplant yield performance under stress conditions. *Agriculture*. 10(7): 254.
- Reyes-Pérez, J.J., Rivero-Herrada, M., García-Bustamante, E.L., Beltran-Morales, F.A., y Ruiz-Espinoza, F.H. 2020. Aplicación de quitosano incrementa la emergencia, crecimiento y rendimiento del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de invernadero. *Biotecnia*. 22(3): 156-163.
- Sabatino, L., Ntatsi, G., Iapichino, G., D'Anna, F., y De Pasquale, C. 2019. Effect of selenium enrichment and type of application on yield, functional quality and mineral composition of curly endive grown in a hydroponic System. *Agronomy*. 9(4): 207.
- Shekari, L., Kamelmanesh, M.M., Mozafarian, M. y Sadeghi, F. 2016. Beneficial effects of selenium on some morphological and physiological trait of hot pepper (*Capsicum annum*). *Journal Of Horticultural Science*. 29(4): 594-600.
- Simkin, A.J., López-Calcano, P.E., y Raines, C.A. 2019. Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *Journal of Experimental Botany*. 70(4): 1119-1140.
- Ślusarczyk, J., Wierzbicka, M., Suchocki, P. y Kuraś, M., 2015. Ultrastructural changes in onion (*Allium cepa* L.) root tip meristem cells treated with Selol and sodium selenate (IV). *Caryologia*. 68(4): 306-316.
- Sun, H.W., Ha, J., Liang, S.X., y Kang, W.J. 2010. Protective role of selenium on garlic growth under cadmium stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 41(10): 1195-1204.
- Tredenick, E.C., Forster, W.A., Pethiyagoda, R., van Leeuwen, R.M., y McCue, S.W. 2021. Evaporating droplets on inclined plant leaves and synthetic surfaces: Experiments and mathematical models. *Journal of Colloid and Interface Science*. 592: 329-341.
- Trejo-Téllez, L.I., García-Jiménez, A., Escobar-Sepúlveda, H.F., Ramírez-Olvera, S.M., Bello-Bello, J.J., y Gómez-Merino, F.C. 2020. Silicon induces hormetic dose-response effects on growth and concentrations of chlorophylls, amino acids and sugars in pepper plants during the early developmental stage. *PeerJ*. 8, e9224.
- Wang, Y., Chu, Y., Wan, Z., Zhang, G., Liu, L., y Yan, Z. 2021. Root Architecture, Growth and Photon Yield of Cucumber Seedlings as Influenced by Daily Light Integral at Different Stages in the Closed Transplant Production System. *Horticulturae*, 7(9): 328.

- Waraich, E.A., Rashid, F., Ahmad, Z., Ahmad, R., y Ahmad, M. 2020. Foliar applied potassium stimulate drought tolerance in canola under water deficit conditions. *Journal of Plant Nutrition*. 43(13): 1923-1934
- Xia, Q., Yang, Z., Shui, Y., Liu, X., Chen, J., Khan, S., y Gao, Z. 2020. Methods of Selenium Application Differentially Modulate Plant Growth, Selenium Accumulation and Speciation, Protein, Anthocyanins and Concentrations of Mineral Elements in Purple-Grained Wheat. *Frontiers in Plant Science*. 11: 1114.
- Yin, H., Qi, Z., Li, M., Ahammed, G.J., Chu, X. y Zhou, J. 2019. Selenium forms and methods of application differentially modulate plant growth, photosynthesis, stress tolerance, selenium content and speciation in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and environmental safety*. 169: 911-917.

Propagación asexual de *Bursera glabrifolia* (Sapindales: Burseraceae) bajo diversas condiciones agronómicas de crecimiento

Asexual propagation of *Bursera glabrifolia* (Sapindales: Burseraceae) under various agronomic growing conditions

Hernández-Cruz KH*, Córdova-Campos O, García-Figueroa G, García-Pérez F

Ingeniería en Agronomía, NovaUniversitas. Carretera a Puerto Ángel km. 34.5, CP 71513, Ocotlán de Morelos, Oax. México

RESUMEN

Dada la importancia que tiene *Bursera glabrifolia* (Kunth) Engl. en el estado de Oaxaca, para la elaboración de alebrijes, la investigación se realizó con el objetivo de evaluar el prendimiento de estacas de *B. glabrifolia* en función de dos fechas de plantación (5 de diciembre y 26 de marzo), cuatro sustratos (proporciones de suelo sin uso agrícola: lombricomposta: 100:0, 75:25, 50:50 y 25:75) y cinco profundidades de plantación (5, 10, 15, 20 y 25 cm). El experimento se realizó bajo un diseño experimental factorial 2x4x5 con arreglo completamente al azar. Con ello se pudo encontrar que las estacas sembradas en marzo tuvieron una respuesta favorable en comparación con las establecidas en diciembre. La plantación a 5 cm de profundidad mejoró el prendimiento de las estacas en la fecha de siembra de marzo. A su vez se pudo observar que la fecha y profundidad de propagación, es un factor importante a considerar ya que, de ello depende la supervivencia de las nuevas plantas.

Palabras clave: enraizamiento; estacas; Oaxaca.

ABSTRACT

Due to the importance of *Bursera glabrifolia* in Oaxaca State for alebrijes elaboration, the research was carried out with the objective of evaluating the taking of *B. glabrifolia* cuttings based on two planting dates (December 5 and March 26), four substrates (proportions of soil without agricultural use: vermicompost: 100:0, 75:25, 50:50 and 25:75) and five planting depths (5, 10, 15, 20 and 25 cm). The experiment was carried out under a 2x4x5 factorial experimental design with a completely randomized arrangement. With this, it was found that the cuttings planted in March had a favorable response compared to those established in December. Planting at a depth of 5 cm improved the taking of cuttings at the sowing date of March. In turn, it was observed that the date and depth of propagation is an important factor to consider since the survival of the new plants depends on it.

Key words: rooting; stakes; Oaxaca.

INTRODUCCIÓN

La propagación sexual del género *Bursera* tiene bajos porcentajes de germinación aún cuando a las semillas les es aplicado algún tratamiento pregerminativo (Bonfil-Sanders *et al.*, 2008). Castellanos-Castro y Bonfil (2013), Loeza-Corte *et al.* (2013) entre otros investigadores, propagaron a *Bursera*

glabrifolia (Sapindales:Burceraceae) por medio de estacas, no obstante los porcentajes de enraizamiento son bajos. Zahawi y Holl (2009) mencionan que los campesinos locales propagan algunas especies de *Bursera* por medio de estacas largas (~1.5 m de largo), sin embargo, el uso de largas ramas limita el número de plantas que se pudieran obtener y a la vez generaría un impacto negativo en pequeñas poblaciones de *Bursera*.

La lombricomposta es el producto de transformaciones bioquímicas y microbiológicas de la materia orgánica, al pasar a través del tracto digestivo de las lombrices que a su vez mejora las características estructurales del suelo, teniendo un impacto benéfico al estimular el eficiente desarrollo del crecimiento (Edwards *et al.*, 1984; Alvarado-Ruffo *et al.*, 2012; Reyes-Pacheco *et al.*, 2017). Rzedowski y Kruse (1979), indicaron que se desconoce el tipo de suelo en el que se desarrollan las *Burseraceae*, *grosso modo* mencionan que los individuos se encuentran en cerros, suelos de ladera, tierras aluviales profundas, terrenos con drenaje deficiente sin discriminar ningún tipo de roca madre, hasta la fecha se sigue desconociendo el dato.

La profundidad de plantación es un factor detonante para el prendimiento de *Bursera* (Bonfil-Sanders *et al.*, 2007), cabe mencionar que para el caso de arboles ornamentales de tronco ramificado la efectividad de prendimiento radica al dejar el tallo al descubierto de 2.5-3 cm de la superficie del suelo, mientras que para otras especies la estaca se entierra en su totalidad Toogood (2010).

La madera del género *Bursera* es de importancia económica en el estado de Oaxaca, debido a que es la base para la elaboración de alebrijes (artesanías) (Purata *et al.*, 2004). Por lo cual se requieren de técnicas que ayuden y mejoren la reproducción de la especie para su aprovechamiento (Bonfil-Sanders *et al.*, 2007).

La palabra "copal" proviene del vocablo Náhuatl "copalli" (resina) y cuahuil (árbol), el árbol se designa copal-cuahitl, refiriéndose así a varias resinas aromáticas (Hill, 1965; Cházaro-Basañez *et al.*, 2010). La familia Burseraceae está constituida por 17 géneros y aproximadamente 540 especies distribuidas en América Tropical, África, Ceilán, Madagascar, Arabia, India y Malasia (Mabberley, 1987). El género *Bursera* comprende árboles y arbustos distribuidos en la selva baja caducifolia, algunas especies forman parte de la composición de bosques espinosos y de matorrales xerofitos, otras se encuentran en el bosque tropical subcaducifolio y aún en el

*Autor para correspondencia: Karen Harumi Hernández Cruz
 Correo electrónico: harumicruz03@hotmail.com

perennifolio (Rzedowski y Kruse, 1979); generalmente son árboles de tamaño bajo o medio (5 a 15 m); corteza gris, amarilla o roja, delgada y con frecuencia no exfoliante, la mayoría de sus especies son caducifolias en la temporada seca y florecen al final de la misma (Bonfil-Sanders *et al.*, 2007; Rzedowski *et al.*, 2005).

El objetivo de la investigación fue evaluar el prendimiento de estacas de copal (*Bursera glabrifolia* (Kunth)) Engl. con asociación de dos fechas, cuatro proporciones de suelo-lombricomposta y cinco profundidades de plantación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La fecha recomendada para propagar *B. glabrifolia* es definida en marzo cuando los árboles están en reposo (Castellanos-Castro y Bonfil, 2013), no obstante Bonfil-Sanders *et al.* (2007) menciona que en un ensayo colectaron estacas del género *Bursera* al final de las temporadas de lluvias (noviembre) pero con diferentes condiciones, tales que no son comparables con su propio experimento y menciona que no produjeron raíces, lo cual permite establecer una brecha en su reproducción, por ello las fechas del 26 de marzo y el 5 de diciembre fueron elegidas para hacer el compartivo, dado que en 2016 se realizó un ensayo en NovaUniversitas por los autores del artículo en curso, con la propagación de *B. glabrifolia* por estacas, donde se utilizaron enraizadores (agua de coco y fitoreguladores sintéticos) y sustratos (abono de borrego, vermicomposta y suelo de la región), en el experimento se pudo percibir que la especie enraizó en temporada invernal.

Instalaciones

El experimento se realizó en el vivero con malla del 40 % sombra, estructura de tubo galvanizado, con una división en su interior de madera. Las condiciones climáticas del municipio de Ocotlán de Morelos fueron temperatura media anual de 19.4 °C, temperatura mínima 12 °C y máxima 24.7 °C; precipitación anual de 811.3 mm, donde el periodo lluvioso es comprendido de junio a septiembre (CONAGUA, 2010).

Preparación de sustratos

El suelo se obtuvo en NovaUniversitas (16°47'11.5" N, 96°40'30.7" W) (INEGI, 2018), con la característica de que no fuera de uso agrícola, dado que en la región se acostumbra a sembrar de temporal los cultivos de maíz, frijol y calabaza, con labranza por medio de yunta y fertilizaciones granuladas ricas en nitrógeno. El pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica y textura se determinaron en las instalaciones del CIIDIR Oaxaca (Tabla 1). La lombricomposta fue elaborada en el mismo lugar. Se tamizaron ambos sustratos para obtener un tamaño de partícula de hasta 5 mm. Los sustratos se mezclaron en las proporciones suelo:lombricomposta S1 (100:0), S2 (75:25), S3 (50:50) y S4 (25:75) (López *et al.*, 2015). Una vez realizada esta labor se dio paso a la desinfección realizada por vaporización, colocando 80 dm³ de suelo a baño maría en contenedores con 30 L de agua a 80°-82 °C durante 30 minutos (Chávez-Aguilera *et al.*, 2010).

Tabla 1. Análisis de suelo utilizado en la propagación de *B. glabrifolia*.
Table 1. Analysis of soil used for *B. glabrifolia* propagation.

Parámetro	Unidad de medida	Interpretación ¹
pH	8.14	Medianamente alcalino
Conductividad eléctrica	0.632 dS m ⁻¹	Efectos despreciables de salinidad
Contenido de materia orgánica (%)	4.03	Alto
Textura		Franco arenoso

De acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000.

Colecta de material vegetativo

Para los fines del experimento se realizaron dos colectas de material vegetativo en San Jerónimo Taviche paraje "La Colorada" (16°40'26" N, 96°33'17.52" W) (INEGI, 2018), Ocotlán de Morelos, Oaxaca, el 4 de diciembre del 2017 y el 25 de marzo del 2018.

De acuerdo con Castellanos-Castro y Bonfil (2013) se eligieron 30 árboles con porte sano, vigoroso y copa expuesta al sol, en estado de reposo, sin tomar más de dos estacas por rama. De cada árbol se obtuvieron 20 estacas que correspondieron de ramas apicales laterales con yemas vegetativas, un grosor de aproximadamente de 12.4 ±3.2 mm y una longitud de 30 cm. Las estacas se etiquetaron y colocaron en bolsas de polietileno transparente, y se plantaron antes de las 24 h.

Preparación de la plantación

Dos días antes de la plantación se realizó un riego a capacidad de campo. Posteriormente se adecuó la estaca de 26±2.0 cm, corte basal biselado, con cuatro yemas distribuidas en toda la estaca; en la parte basal de las estacas se realizaron dos cortes longitudinales de ~5 cm con 1-2 mm de profundidad (Bonfil-Sanders, 2007).

Posteriormente se preparó una solución con ácido Indol-3-butírico (Radix® 10 000) 1.25 g L⁻¹, las estacas se sumergieron por un minuto en la solución a la profundidad de plantación propuesta 5, 10, 15, 20 y 25 cm. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó un agujero cónico en el sustrato con una varilla de 40 cm de longitud y un grosor de 1.25 cm, la plantación en los sustratos consistió en enterrar la estaca a la profundidad propuesta. Los riegos fueron cada 48 horas a capacidad de campo, sin suministro adicional de fertilizante. Se realizaron aplicaciones periódicas de Pevicare® (Propamocarb clorhidrato: Propil 3(dimetilamino) propilcarbamatohidrocloruro) (1 ml/L) y Captan® (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2- dicarboximida) (1 g/L) (una vez por mes). El control de malezas fue manual.

Variables evaluadas

Variables no destructivas. La medición se realizó cada 24 horas. Días de aparición de la yema (DA), contabilización de las yemas que de un momento a otro aparecen; días a brot-

ación (DB), se contabilizó el número de días al momento que se observó el desarrollo de la yema (aparición de una hoja pequeña); tiempo de brotación TB = DB-DA.

Variables destructivas. La medición se realizó pasadas 12 semanas después de la siembra. Longitud de la raíz más larga (cm) mediante el uso de hojas milimétricas; número de brotes aéreos, contabilización de brotes ≥ 0.5 cm de longitud; longitud de los brotes (cm) la medición se realizó al cortar el brote y medirlo a lo largo con una hoja milimétrica; número de hojas por conteo de hojas formadas al deshacer el brote. Para cada variable se obtuvo la biomasa, las muestras se secaron por medio de una estufa de secado tradicional, hasta obtener peso constante, el peso se tomó con la balanza analítica de precisión (Velab®, modelo VE-204). Una vez obtenidos los datos se calcularon los porcentajes de enraizamiento, brotes y callos. El porcentaje de enraizamiento (Pe), calculado con la fórmula $Pe = \frac{\text{Estacas enraizadas (Ee)}}{\text{Total de estacas (Te)}} (100)$, estacas enraizadas si el individuo tenía al menos una raíz de 2 mm; porcentaje de estacas brotadas $Pb = \frac{\text{Estacas brotadas (Eb)}}{\text{Total de estacas (Te)}} (100)$, estacas brotadas si el individuo mostraba un brote mayor a 0.5 cm; porcentaje de callos $Pc = \frac{\text{Estaca con presencia de callos (Ec)}}{\text{Total de estacas (Te)}} (100)$ (Loeza-Corte *et al.*, 2013; Ruíz-García *et al.*, 2005).

Análisis estadístico

Para los análisis de la información en cada tratamiento se tuvo una población de 30 estacas. Se realizó un análisis de varianza factorial donde se analizaron los factores e interacciones por fecha de plantación (A), sustrato (B) y profundidades (C). Las variables que correspondieron a porcentajes de estacas brotadas, callos y enraizamiento, se realizó mediante un ANOVA factorial con modelo aditivo.

La prueba de comparación de medias de todas las variables se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El análisis de la información estadística fue con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) 9.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de fechas de plantación en el desarrollo de estacas de *B. glabrifolia*

Se determinó que la fecha de plantación 26 de marzo (primavera) fue mejor que la de 5 de diciembre (invierno) debido a que los días de aparición de yemas fueron más rápidos, ya que se presentaron a los 18 días (Figura 1a), dicha variable indica que existió una fuerte interacción con el medio ambiente donde se desarrolló (79.21 %) (Tabla 2), el número de hojas fue mayor con respecto a la fecha de invierno en un 234.31 % (Figura 1b); la longitud del brote de la misma forma fue más largo en un 194.26 % (Figura 1c), por ende la biomasa de brote tuvo la misma respuesta con un 700 % mayor con respecto a la fecha de invierno (Figura 1d).

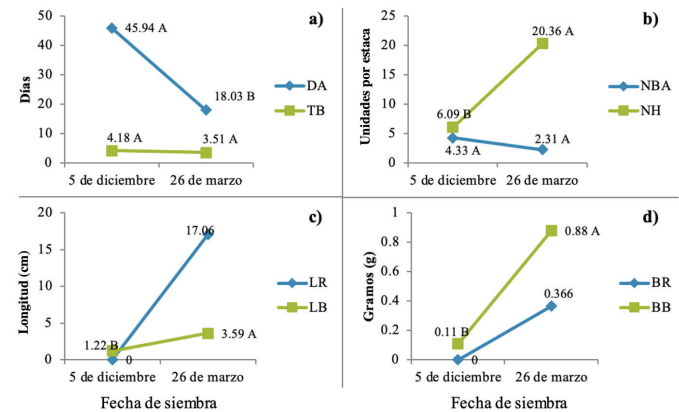


Figura 1. a) variables no destructivas; b) número de brotes y hojas por estaca; c) longitud de brote y raíz; d) biomasa de brote y raíz. Prueba de comparación de medias en estacas de *B. glabrifolia* en dos fechas de plantación. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). DA (Días de aparición de la yema); TB (Tiempo de brotación); NBA (Número de brotes aéreos); NH (Número de hojas); LB (Longitud de brote); LR (Longitud de raíz); BB (Biomasa de brote); BR (Biomasa de raíz).

Figure 1. Means comparison test in *B. glabrifolia* cuttings at two planting dates. Values with the same letter are statistically equal (Tukey, 0.05). DA (Days of bud appearance); TB (Budding Time); NBA (Number of aerial shoots); NH (Number of leaves); LB (Length of Shoot); LR (Root Length); BB (sprout biomass); BR (Root biomass).

Tabla 2. Contribución relativa (%) de las variables destructivas y no destructivas evaluados en estacas de *B. glabrifolia*.
Table 2. Relative contribution (%) of destructive and non-destructive variables evaluated in *B. glabrifolia* cuttings.

Fuente de variación	Variables destructivas		Variables no destructivas					
	DA	TB	NBA	NH	LB	LR	BB	BR
Fecha	79.21	1.64	42.39	2.78	21.94	-	12.34	-
Sustrato	1.69	16.86	1.59	2.55	0.31	8.82	2.21	22.95
Profundidad	6.96	24.75	29.53	83.61	35.86	35.90	49.83	57.85
AxB	1.97	9.82	8.51	2.79	23.42	-	18.97	-
AxC	1.01	11.03	2.55	0.81	0.36	-	1.73	-
BxC	7.14	17.83	10.20	6.55	13.98	55.28	11.54	19.20
AxBxC	2.02	18.07	5.22	0.91	4.12	-	3.39	-
Suma	100.00	100.00	100.0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

A (fecha de plantación); B (sustrato); C (profundidad); DA (Días de aparición de la yema); TB (Tiempo de brotación); NBA (Número de brotes aéreos); NH (Número de hojas); LB (Longitud de brote); LR (Longitud de raíz); BB (Biomasa de brote); BR (Biomasa de raíz).

Tal comportamiento de las variables se debió a que las condiciones ambientales tienen un papel fundamental en el desarrollo de las especies (Castillo-Flores *et al.*, 2013). El efecto causado por el tiempo atmosférico, retardó y aceleró el desarrollo de los brotes, ya que en días con temperaturas bajas los brotes retardaron su desarrollo y en temperaturas cálidas los brotes se desarrollaban en menor tiempo (~2 días), tales datos concuerdan con Rodríguez-Cabello *et al.* (2015) donde en *Carica papaya* reportaron tasas de crecimiento lento en la temporada de noviembre-marzo y crecimiento acelerado con temperaturas más cálidas, pues el desarrollo del área foliar depende de la intercepción de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), necesaria para la producción de biomasa y aporte correspondiente al rendimiento (Soto-Carreño *et al.*, 2012). Así mismo en la producción de caña, las fechas de siembra que comprenden temporadas invernales el rendimiento de follaje disminuye (Jiménez *et al.*, 2020).

En cuanto al tiempo de brotación y número de brotes aéreos (Figura 1a, 1b) no se presentaron diferencias significativas entre las fechas, pero superaron los datos de Jarquín-Ríos *et al.* (2014), quienes mencionan que la propagación por estacas de *B. glabrifolia* con diferentes grados de lignificación la brotación se da a los 60 días. Con la metodología implementada durante la investigación se superaron los porcentajes de estacas brotadas de *B. morelensis* y *B. galeottiana* con bajos grados de lignificación (Loeza-Corte *et al.*, 2013). Así como los porcentajes de callos presentados por Bonfil-Sanders *et al.* (2007) y Mero-Jalca *et al.* (2017).

Por otra parte, el comportamiento de los brotes durante la temporada invernal en algunos casos se observaron cubiertos de resina y el desarrollo vegetativo sin anomalías. Con respecto a las yemas que estuvieron inmersas en el sustrato de la fecha 5 de diciembre, las estacas generaron brotes albinos al final de la estancia del cultivo (los brotes no fueron considerados en el análisis estadístico). Dicho comportamiento estuvo asociado a la calidad e intensidad de la luz, ya que la radiación fotosintéticamente activa (PAR) no llegó a los brotes y la fijación de carbono no fue efectiva (Casierra-Posada *et al.*, 2011). Durante la estancia del cultivo en ambas fechas, se pudo observar la presencia de pseudobrotes, brotes que emergieron y marchitaron gradualmente, debido al contenido de sustancias nutritivas en el material vegetal (Morillo-Infante *et al.*, 2016; Mero-Jalca *et al.*, 2017).

El enraizamiento en invierno no tuvo éxito, debido a que no se propiciaron las condiciones necesarias para la diferenciación de células parenquimatosas, encargadas de la regeneración de tejido (Mero-Jalca *et al.*, 2017), no obstante, en primavera, se presentó el 10.83 % de enraizamiento de la población total. Con ello se puede atribuir que *B. glabrifolia* es de difícil enraizamiento y la mejor fecha para el enraizamiento es el 26 de marzo, ya que Bonfil-Sanders (2007) obtuvo enraizamientos hasta del 50 %, Arellano-Ostoa *et al.* (2018) 35 % con *B. linaloe*; Loeza-Corte *et al.* (2013) 20 % en *B. morelensis* y 12 % en *B. galeottiana* y Mero-Jalca *et al.* (2017) en *B. graveolens* de 0 %. Se hace mención que el porcentaje de callos presente en invierno fue de 85 % y en primavera de 65.30 %.

El comportamiento de la especie se asocia a las condiciones fisiológicas del material vegetal utilizado y a las condiciones del ambiente donde se desarrolla (Navarrete y Vargas, 2005). Del mismo modo Abanto-Rodríguez *et al.* (2014) mencionan que el porcentaje de enraizamiento se ve influenciado por la variabilidad genotípica de las plantas madre. Asimismo, el potencial de la especie al emitir raíces varía con la época del año y por ello las dosis de enraizador no han podido ser determinadas para la especie (Wendling, 2000). Tal fenómeno se debe a que las especies del género *Bursera* necesitan de estimulantes hormonales ubicados entre las 8 000 y 10 000 ppm para favorecer el desarrollo de raíces (Arellano-Ostoa *et al.*, 2018).

Efecto de los sustratos en el desarrollo de estacas de *B. glabrifolia*

Se observó que el sustrato donde se desarrollaron las estacas de *B. glabrifolia* generaron diferentes respuestas en los días de aparición de la yema por el contenido de lombricomposta, ya que el sustrato S3 (50 % suelo sin uso agrícola: 50 % lombricomposta) fue en donde las yemas aparecieron más temprano comparado con el sustrato S4 donde la aparición de yemas tomó 6 días más. Sin embargo, se observó que a bajos contenidos de materia orgánica (S1) el tiempo de brotación ocurre en menor cantidad de días, caso que contrasta con los sustratos S3 y S4 donde los brotes tardaron 3 días más en desarrollarse (Tabla 2) (Figura 2a).

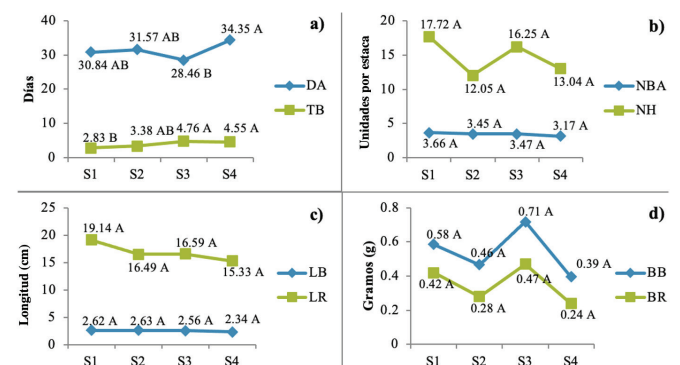


Figura 2. a) variables no destructivas; b) número de brotes y hojas por estaca; c) longitud de brote y raíz; d) biomasa de brote y raíz. Prueba de comparación de medias de estacas de *B. glabrifolia* en cuatro sustratos. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). DA (Días de aparición de la yema); TB (Tiempo de brotación); NBA (Número de brotes aéreos); NH (Número de hojas); LB (Longitud de brote); LR (Longitud de raíz); BB (Biomasa de brote); BR (Biomasa de raíz). Sustrato. Proporción suelo sin uso agrícola: lombricomposta. S1=100:0; S2=75:25; S3=50:50; S4=25:75. **Figure 2.** Means comparison test of *B. glabrifolia* cuttings in four substrates. Values with the same letter are statistically equal (Tukey, 0.05). DA (Days of bud appearance); TB (Budding Time); NBA (Number of aerial shoots); NH (Number of leaves); LB (Length of Shoot); LR (Root Length); BB (sprout biomass); BR (Root biomass). Substratum. Proportion of land without agricultural use: vermicompost. S1=100:0; S2=75:25; S3=50:50; S4=25:75.

Dicho fenómeno se le atribuye al contenido de lombricomposta, ya que al considerarlo como enmienda o mejorador de suelo, las dosis utilizadas generalmente son altas en comparación con las de los fertilizantes minerales y su efecto

puede alterar el crecimiento vegetal mediante el incremento de la actividad enzimática, supresión de enfermedades o producción de sustancias reguladoras de crecimiento (Bertsch, 1998; Domínguez *et al.*, 2010). Cabe destacar que este efecto se evaluó en un periodo corto (3 meses) por lo que se recomienda evaluarlo en un periodo más amplio, ya que la adición de lombricomposta influye en la dinámica de la estabilidad de los agregados (Ochoa-Espinosa *et al.*, 2018).

Las variables número de brotes aéreos (NBA), número de hojas (NH), longitud de brote (LB), longitud de raíz (LR), biomasa de brote (BB), biomasa de raíz (BR) (Figura 2b, 2c, 2d), porcentajes de estacas brotadas y porcentajes de enraizamiento no presentaron diferencias significativas.

Por otro lado, el porcentaje de callos se vio afectado por el sustrato, ya que a mayor contenido de lombricomposta en los sustratos de invierno se obtuvieron altos porcentajes de callos (95.33 %), caso contrario con primavera donde a menor contenido de lombricomposta el porcentaje de callos fue de 76.66 % (Tabla 4), de manera general (ambas fechas) los sustratos no fueron diferentes estadísticamente en las variables presentadas en la Figura 2. Por lo cual se atribuye que el enraizamiento no depende del sustrato donde se desarrolla, ya que el género *Bursera* no hace distinción de este (Rzedowski y Kruse, 1979; Cuisance, 1998).

Los días de aparición de la yema y el tiempo de brotación de *B. glabrifolia* en los sustratos S3 y S4 fueron beneficiados con la adición de lombricomposta, ya que incrementó el área foliar y el prendimiento, dado que fuente de materia orgánica mejora el desarrollo vegetativo (González-Castellanos *et al.*, 2011).

Efecto de las profundidades de plantación en estacas de *B. glabrifolia*

La profundidad de plantación de *B. glabrifolia*, determinó la cantidad de días para emitir yemas y brotes, se encontró que conforme se aumenta dicha profundidad, los cambios fisiológicos son más precoces, ya que para la profundidad de 5 cm tomó 11 días más en emitir una yema en comparación de la profundidad de 25 cm (Figura 3a).

La profundidad de 5 cm tuvo mayor superficie, lo cual ocasionó que el número de brotes aéreos y su longitud fuera mayor en comparación con los demás tratamientos. Sin embargo, las profundidades de 10, 15, 20 y 25 cm tuvieron un crecimiento similar entre ellas estadísticamente (Figura 3b), lo cual manifiesta que las profundidades de plantación son

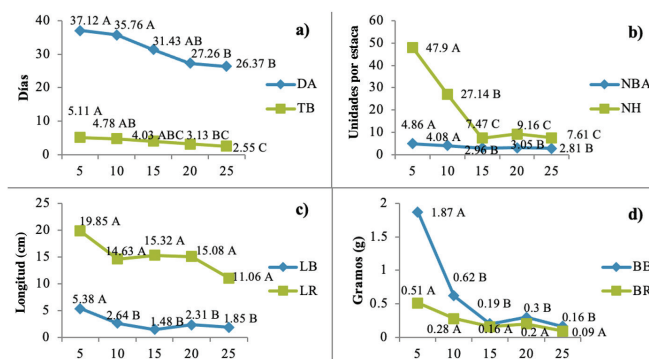


Figura 3. a) variables no destructivas; b) numero de brotes y hojas por estaca; c) longitud de brote y raíz; d) biomasa de brote y raíz. Prueba de comparación de medias de estacas de *B. glabrifolia* en cinco profundidades de plantación (cm). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). DA (Días de aparición de la yema); TB (Tiempo de brotación); NBA (Número de brotes aéreos); NH (Número de hojas); LB (Longitud de brote); LR (Longitud de raíz); BB (Biomasa de brote); BR (Biomasa de raíz). **Figure 3.** Means comparison test of *B. glabrifolia* cuttings at five planting depths (cm). Values with the same letter are statistically equal (Tukey, 0.05). DA (Days of bud appearance); TB (Budding Time); NBA (Number of aerial shoots); NH (Number of leaves); LB (Length of Shoot); LR (Root Length); BB (sprout biomass); BR (Root biomass).

influyentes (Tabla 3) en el desarrollo de biomasa de brotes (Figura 3d). La longitud de raíz no presentó diferencias significativas (Figura 3c).

Se observó que, en invierno, las profundidades de 10 y 20 cm y en primavera profundidades de 20 y 25 cm respectivamente, tuvieron mayor porcentaje de brotación en comparación de la profundidad de plantación de 5 cm. Pero a los 5 cm de profundidad mejoró en 41 % los días a brotación, 100 % el tiempo de brotación, 73 % número de brotes aéreos, 529 % en número de hojas, 191 % longitud de brote, 79 % longitud de raíz, 1069 % biomasa de brote y 467 % biomasa de raíz todas estas variables en comparación con la profundidad de 25 cm.

El comportamiento de las estacas al momento del enraizado fue generar callos en todos los tratamientos, se observó que las profundidades fueron el factor principal para la emisión de callos, ya que conforme se aumenta la profundidad a partir de los 10 cm, el porcentaje de callosidad también aumentó (Tabla 4).

El enraizamiento se le atribuye a la profundidad de plantación en 96.85 % (Tabla 5), debido a que el incremento de la profundidad del enraizamiento se ve disminuido (Figura

Tabla 3. Contribución relativa (%) de los porcentajes de estacas brotadas, callos y de enraizamiento en los tratamientos de estacas de *B. glabrifolia*. **Table 3.** Relative contribution (%) of the percentages from sprouted cuttings, calluses and rooting in the treatments of *B. glabrifolia* cuttings.

Fuente de variación	Porcentajes de estacas brotadas			Porcentaje de callos			Porcentaje de enraizamiento
	Invierno	Primavera	Ambas fechas	Invierno	Primavera	Ambas fechas	Primavera
Sustratos	4.04	28.16	8.73	18.24	38.73	8.08	3.15
Profundidades	95.96	71.84	91.27	81.76	61.27	91.92	96.85
Suma	100	100	100	100	100	100	100

4). Dicho dato concuerda con Martínez-Aguirre (2007) y Ayma-Romay *et al.* (2015), donde en una profundidad de 3 cm se puede tener enraizamientos exitosos en *Tamarix boveana* Bunge (Caryophyllales: Tamaricaceae) y *Polylepis lanata* (Kuntze) (Rosales: Rosaceae).

Tabla 4. Prueba de comparación de medias por sustratos para el porcentaje de callos en estacas de *B. glabrifolia*, en dos fechas de propagación y su interacción.

Table 4. Means Comparison test by substrates for the percentage of callus in cuttings of *B. glabrifolia*, in two spread dates and their interaction.

5 de diciembre			26 de marzo			Ambas Fechas		
Sustratos	Porcentajes		Sustratos	Porcentajes		Sustratos	Porcentajes	
S4	95.33	A	S1	76.66	A	S4	79.00	A
S3	86.67	A	S2	66.0	AB	S1	77.66	A
S2	79.33	A	S4	62.66	AB	S2	72.66	A
S1	78.66	A	S3	56.0	B	S3	71.33	A

Nota. Sustrato S:L, Proporción suelo sin uso agrícola: lombricomposta, S1 (100:0), S2 (75:25), S3 (50:50), S4 (25:75). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Tabla 5. Prueba de comparación de medias para el porcentaje de estacas brotadas y callos de *B. glabrifolia* en dos fechas de propagación y su interacción.

Table 5. Means comparison test for the percentage of sprouted cuttings and calluses of *B. glabrifolia*, at two spread dates and their interaction.

Profundidades (cm)	Invierno			Primavera			Ambas fechas			
	Estacas brotadas (%)		Callos (%)	Estacas brotadas (%)		Callos (%)	Estacas brotadas (%)		Callos (%)	
5	46.6	B	57.5	23.3	C	52.5	35.0	C	55.0	B
10	61.6	A	85.0	42.5	BC	62.5	52.0	B	73.7	AB
15	57.5	AB	95.0	55.8	AB	61.6	56.6	AB	78.3	AB
20	64.9	A	91.6	73.3	A	80.8	69.1	A	86.2	A
25	55.0	AB	95.8	66.6	A	69.1	60.8	AB	82.5	A

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

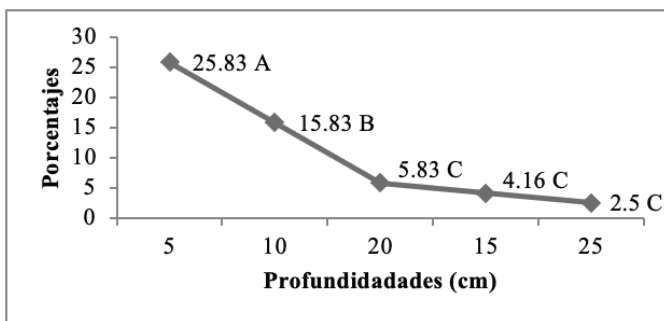


Figura 4. Prueba de comparación de medias de las diferentes profundidades para el porcentaje de enraizamiento de estacas de *B. glabrifolia*. Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey, 0.05).

Figure 4. Means comparison test of the different depths for the *B. glabrifolia* rooting of cuttings percentage. Values with the same letter are statistically equal (Tukey, 0.05).

CONCLUSIONES

La mejor fecha de plantación fue la del 26 de marzo, ya que la emisión de yemas y brotes fue en menor cantidad de días y se presentó enraizamiento en estacas de *B. glabrifolia* a los 5 cm de profundidad. Los sustratos no influyeron en el desarrollo de *B. glabrifolia*. Cabe destacar que, a mayor profundidad de plantación, el tiempo de brotación también se ve reducido.

LITERATURA CITADA

- Abanto R., C., Alves C., E., Sánchez C., J., Andrade dos Santos, V., Bardales L., R. M. y Saldaña R. 2014. Capacidad de enraizamiento de plantas matrices promisorias de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh en cámaras de subirrigación. *Revista Ceres*. 61: 134-140.
- Alvarado R., K., Matos T. y Blanco I. 2012. Evaluación de cinco sustratos en el desarrollo de estacas de ruda (*Ruta chalepensis*: Rutaceae). *Agricultura Orgánica*. 18: 19-21.
- Arellano O., G., González B., S. y Arellano H., G. 2018. El Lináloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón y Medina), especie maderable amenazada: una estrategia para su conservación. *Revista Agroproductividad*. 11: 42-51.
- Ayma R., A. I. 2015. Forma del esqueje de queñua (*Polylepis lanata*) para su enraizamiento. *Boletín Proyecto de Manejo y Restauración de Bosques de Independencia*. 1-4. Cochabamba, Bolivia.
- Bertsch, F. 1998. La fertilidad de los suelos y su manejo. San José Costa Rica: Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo.
- Bonfil S., C., Cajero L., I. y Evans R., Y. 2008. Germinación de semillas de seis especies de *Bursera* del Centro de México. *Agrociencia*. 42: 827-834.
- Bonfil S., C., Mendoza H., P. E. y Ulloa N., J. A. 2007. Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera*. *Agrociencia*. 41: 103-109.
- Casierra P., F., Peña O., J. E. y Ulrich, C. 2011. Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria sp.*) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales Actualidad y Divulgación Científica*. 14: 43-53 .
- Castellanos C., C. y Bonfil, C. 2013. Propagation of three *Bursera* species from cuttings. *Botanical Sciences*. 91: 217-224.
- Castillo F., J. D., López L., M. A., López U., J., Cetina Alcalá, V. M. y Hernández T., T. 2013. Factores de influencia en el enraizamiento de estacas de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. et. Cham. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 19: 176-184.
- Cházaro Basañez, M., Mostul, B. L., & García Lara, F. (2010). Los copales mexicanos (*Bursera spp.*). *Bouteloua*, 7:, 57-70.
- Cuisance, P. 1998. La multiplicación de las plantas y el vivero. Madrid España: Mundi-Prensa.
- Domínguez, J., Lazcano, C. y Gómez B., M. 2010. Influencia del vermicompost en el crecimiento de las plantas. Aportes para la elaboración de un concepto objetivo. *Acta Zoológica Mexicana*. 2: 359-371.
- Edwards, C. A., Burrows, I., Fletcher, K. E. y Jones, B. A. 1984. The use of earthworms for composting farm wastes. *J.K.R. Gasser*. 44: 229-241.
- González C., A., Grenón C., G. N., Vásquez G., L. M., González N., A. y Pérez H., A. 2011. Desarrollo de estacas de *Prunus salicina* injertadas in situ en diferentes sustratos con *lombrihumus*. *Agronomía Mesoamericana*. 22: 329-337.
- Hill, A. F. (1965). *Botánica Económica: Plantas Útiles y Productos Vegetales*. Barcelona.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Mapas. [Consultado 30 de mayo de 2018]. 2018. Disponible en: <http://gaia.inegi.org.mx>

Description of the main attributes (origin, gender, age, body condition, and slaughter weight) at slaughter house arrival and their impact on carcass characteristics from cull Quarter Horse

Descripción de los principales atributos (origen, sexo, edad, condición corporal y peso de sacrificio) a la llegada al matadero y su impacto en las características de la canal del caballo Cuarto de Milla de descarte

Gamboa del Real FJ^a, Carrillo Muro O^b, Aguilera Soto JI^b, Hernández Briano P^b, Rivera Villegas A^b, Barreras Serrano A^c, Plascencia Jorquera A^d, Estrada Angulo A^a, Urías-Estrada JD^a, Castro Pérez BI^{**}

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa. Blvd. San Ángel s/n fraccionamiento San Benito, CP. 80246, Culiacán, Sinaloa, México.

^b Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas, Gral. Enrique Estrada, CP. 80260, Zacatecas, México.

^c Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California. Carretera Mexicali-San Felipe 4.5km, CP 21386, Mexicali, Baja California, México.

^d Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Guasave. Av. Flamingos s/n, CP 81048, Guasave, Sinaloa, México.

ABSTRACT

In order to describe the effects of origin (Mexico and United States of America), sex, age at slaughter (AS, 4 categories), body condition score (BCS, 5 categories) and slaughter weight (SW, 4 categories) on carcass characteristics of culled quarter horses, data from 235 horses sacrificed in the same slaughter facility within a 150 days period were analyzed. Overall, 74.5% were from the US, 80% were < 15 years of age and had BCS ≤ 4, and sex proportion was similar (51.5% female vs 48.5% males). Horses from USA had heavier SW (27%), leg circumference (4%), carcass weight (4.2%) and carcass yield (2.9%). Sex did not affect any characteristics evaluated. Horses from 3 to 8 years had greater rib eye area (REA) and backfat thickness. Except for leg length, as BCS and SW improved, all carcass characteristics linearly increased as BCS and SW increased. It is concluded that origin, sex, and age, explained very little on the carcass characteristics. The slaughter weight mainly explained changes in linear measures, carcass weight, and compact index, while BCS mainly explained carcass yield and REA.

Keywords: Equine, Quarter horse, attributes at slaughter, carcass traits.

RESUMEN

Para describir los efectos de origen (México y Estados Unidos de América), sexo, edad al sacrificio (AS, 4 categorías), puntaje de condición corporal (BCS, 5 categorías) y peso de faena (SW, 4 categorías) se utilizaron datos de 235 caballos cuartos de milla sacrificados en una misma instalación durante un período de 150 días. Del total, el 74.5 % provenían de EUA, el 80 % fue <15 años y una BCS ≤ 4, la proporción de sexos fue similar (51.5 % hembras vs 48.5 % machos). Los caballos EUA presentaron mayor SW (27 %), circunferencia de pierna (4 %), peso en canal (4.2 %) y rendimiento en canal (2.9 %). El sexo no afectó ninguna característica evaluada. Los

caballos de 3 a 8 años presentaron mayor área del ojo de la costilla (REA) y grasa dorsal. Exceptuando la longitud de pierna, las características de la canal aumentaron linealmente a medida que aumentaron BCS y SW. Se concluye que origen, sexo y edad explican poco sobre las características de la canal. El peso al sacrificio explicó principalmente los cambios en las medidas lineales, peso de la canal e índice compacto, mientras que BCS explicó principalmente el rendimiento de la canal y REA.

Palabras clave: Equino, cuarto de milla, atributos al sacrificio, rasgos de canal

INTRODUCTION

A relationship between horses and humans has existed for around 12,000 years. There is evidence that, before horse domestication, their first use was as a food source (Hintz, 1995). Currently, meat horse production represents 0.24 % of total world meat production (~740 thousand tons), and has remained without significant changes over the last decades (FAOSTAT, 2018).

The estimated per capita worldwide consumption of equine meat is 0.10 kg, traditionally the main consumers are European countries, although there are those such as Mexico which stands out in horse meat production and export; although, the acceptability of this meat by Mexican consumers is still unknown (Gill, 2005). Even though horse meat has properties that can be considered as a "healthy meat" (Lorenzo *et al.*, 2010), is not popular in most countries as food for humans. It has been corroborated that regular consumption of horse meat significantly reduces serum levels of total cholesterol and low-density lipoproteins, while increasing polyunsaturated fatty acids levels which it's improving people's health (Del Bó *et al.*, 2013). Currently, a major concern for consumers is to demand that foods have passed a rigorous classification and evaluation process be-

*Autor para correspondencia: Beatriz Isabel Castro Pérez
 Correo electrónico: laisa_29@hotmail.com

Recibido: 13 de agosto de 2021

Aceptado: 13 de enero de 2022

fore being introduced to the market. Even though in Mexico there are well-defined regulations and procedures to classify beef, sheep, pork and poultry meat (taken into consideration age and weight at slaughter, sex, and body conditions score, among others), in the case of horses there is little information in this regard, even though the amount of horses being slaughtered is increasing. Hence, the establishment of regulation protocols becomes more relevant because a large part of the horses slaughtered in Mexico come from outside the country. For this reason, the objective of this study was to determine the effects of sex, age and weight at slaughter, and body condition score on culled quarter horse carcass characteristics. Due to the important proportion of horses from USA that are sacrificed in Mexico, origin (USA and Mexico) was included as a factor in the study.

MATERIAL AND METHODS

Sample size, slaughter procedures, data registration

In order to describe the effects of origin (Mexico and United States), sex, age at slaughter (AS, 4 categories), body condition score (BCS, 6 categories) and slaughter weight (SW, 4 categories) on carcass characteristics of culled quarter horses, data from 235 horses sacrificed during a 150 days period (January to May) in Federal Inspection Type # E 42 processing plant (Empacadora de Carnes de Fresnillo, S.A. de C.V., Fresnillo City, Zacatecas, México, located in the north-central region of México 23°11'08.75"N and 102°51'49.95W) were analyzed.

Horses were stunned (captive bolt), exsanguinated and skinned following the Federal Mexican standard rules (NOM-033-SAG/ZOO-2014, slaughter methods of domestic and wild animals). Two weekly visits were made to slaughterhouse facility during a period from January to May 2017. During this period, a total of 2300 horses were slaughtered, within these horses, we randomly choose horses until completing a sample size of 235 horses (10 % of total). Different categories were assigned according to each factor as follows: origin (2 categories; Mexican and USA), sex (2 categories; males and females), age (4 categories; <3, 3 to <8, 8 to 15 and >15 years), body condition score (BCS, 6 categories, 1=emaciated, 6=obese), and 4 categories for slaughter weight (SW, 151-250, 251-350, 351-450 and >450 kg). The individual SW was obtained in a digital livestock scale (TORREY, OPG-2000, CIMSA, Zacatecas, Zacatecas) before horse immobilization, BCS was determined visually when animals were in the processing line just before slaughter according to a system established by the University of Kentucky (Wood, 1995), sex was also visually determined in the processing line (all males arrived castrated), origin according to skin branding and by the mobilization papers, age was determined after slaughter by dentition study following procedures described by Richardson *et al.* (1995).

After all carcasses were ready to be moved into a cold chamber, hot carcass weight (HCW) was obtained, considering total body weight after horses were bled, skinned, eviscerated, and head and limbs removed, utilizing an aerial

digital scale (Sipel, model R600, Rosario, Argentina). Immediately after split carcasses entered the cold chamber, measurements of the rib eye area (REA) and backfat thickness (FT) between the 12th and 13th rib were obtained by means of ultrasonography (ALOKA, ProSound 3500, Seattle WA, USA), after this procedure, morphometric measurements of the left carcass were performed, this included carcass length, chest depth, leg length and leg circumference (De Boer *et al.*, 1974). From this data, the compactness index was calculated as the cold carcass weight divided by the carcass length, the above, as a means to estimate the amount of meat in the carcass. After carcasses chilled in a cooler at -4 to 1°C for 24 h, the cold carcass weight (CCW) was registered, difference between HCW and CCW was considered as cooling loss (CL). Hot carcass yield and cold carcass yield were calculated as a percentage of SW.

Statistical analyses

All the data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. The MIXED procedure of SAS was used to analyze the variables origin and sex. For variables assigned with categories (AS, BCS, and SW)

The best fit linear model used were:

For age: $Y_{ijklm} = \mu + O_i + S_j + AS_k + \epsilon_{ijklm}$

For BCS: $Y_{ijklm} = \mu + O_i + S_j + BCS_l + \epsilon_{ijklm}$

For AS: $Y_{ijklm} = \mu + O_i + S_j + SW_m + \epsilon_{ijklm}$

Coefficients for polynomial contrasts (linear, quadratic and cubic effects of age, BCS, and SW) with unequal spacing were determined. In addition, separation of the means by T-test multiple comparisons between categories in each variable (AS, BCS, and SW) were performed. Differences were considered significant when the P-value was ≤ 0.05 , and tendencies identified when the P-value was > 0.05 and ≤ 0.10 . Polynomials were considered significant when the P-value was ≤ 0.05 , and tendencies were identified when the P-value was > 0.05 and ≤ 0.10 .

RESULTS AND DISCUSSION

Overall, the average slaughter weight was 364.6 ± 90 kg. Adult quarter horse carcass weight from 400-570 kg, the lower weight registered in this study was mainly due to the lower BCS and weight loss during transportation and management. A 74.5 % of slaughter horses were from the United States of America (USA). This large proportion of horses coming from the USA for slaughter in Mexico is due to the closure of horse slaughter plants in the United States by the law "American Horse Slaughter prevention", which prevents the slaughter of equines for human consumption in that country (112th Congress act 2011-2012). Accordingly, USA horse exports for slaughter increased by 148 and 660 percent to Canada and Mexico, respectively (Forrest, 2017, The Atlantic Journal). Almost 50 % of slaughtered horses were 8 years old or older, and had lower BCS. This can be explained since currently horse meat producers in USA have decreased. As expected, sex proportion was similar (51.5 % female vs 48.5 % males).

Horses from USA had a heavier ($P<0.05$) SW (389 vs 283 kg), greater leg circumference (4 %) and compactness index (4.4 %), heavier HCW (215 vs 206 kg), and greater carcass yield (59.02 vs. 57.29 %) without difference on REA nor BFT when compared to Mexican horses (Tables 1 and 2). This could be due to the different production systems used in each country; since these are not well defined they cannot be evaluated as these animals fulfill different functions, not as food animals. Franco *et al.* (2013) mentioned that the differences in the carcass morphometric measurements are related to the different genotypes, and not by feed, when are raised in similar production systems. Either way, previous reports had denoted that carcass performance in horses is highly variable. For example, Lanza *et al.* (2009), similar to our findings, registered a 59 % carcass yield in Sanfratellano and Haflinger horses. However, carcass yields up to 67 % have been reported for Burguete horses with ages between 16 and 24 months and a SW close to 400 kg. This is in agreement with carcass yield of 65 and 68 % registered for Burguete and Hispano-Breton horses slaughtered at 18 months of age

Tabla 1. Frecuencia y distribución de las características evaluadas de los caballos Cuarto de Milla sacrificados según el lugar de origen: México o Estados Unidos (EE.UU)

Table 1. Frequency and distribution of evaluated characteristics of slaughtered Quarter Horses according to place of origin: Mexico or Unites States (USA).

	Origin	
	México	USA
N	60	175
Frequency, %	25.5	74.5
Slaughter weigh, kg	293.2	389.1
Males	31 (51.7%)	92 (47.5%)
Females	29 (48.3%)	83 (52.5%)
Years of age		
<3	25 (41.7%)	35 (20.0%)
3 a <8	10 (16.7%)	55 (31.1%)
8 a <15	12 (20.0%)	52 (29.7%)
>15	13 (21.7%)	33 (18.9%)
Body score condition ¹		
1	13 (21.7%)	26 (14.9%)
2	19 (31.7%)	40 (22.9%)
3	19 (31.7%)	44 (25.1%)
4	6 (10%)	25 (14.3%)
5	2 (3.3%)	18 (10.3%)
6	1 (1.7%)	14 (8.0%)
7	0 (0.0%)	8 (4.6%)

¹ body condition score 1= emaciated, 5= obese.

Tabla 2. Medias de mínimos cuadrados de las características de la canal de caballos Cuarto de Milla de según su origen

Table 2. Least square means of Quarter Horse carcass characteristics according to their origin.

	Origin		
	México	USA	MSE
N	60 (25.5%)	175 (74.5%)	
Carcass characteristics			
Longitude, cm	129.0	129.6	1.26
Chest depth, cm	78.1	77.2	0.76
Leg length, cm	84.3	83.3	0.79
Leg circumference, cm	96.6 ^a	100.4 ^b	1.08
Compactness index	1.52 ^a	1.59 ^b	0.02
Hot carcass weight, kg	206.1 ^a	215.1 ^b	3.69
Cold carcass weight, kg	200.5 ^a	209.4 ^b	3.66
Hot carcass yield, %	57.29 ^a	59.02 ^b	0.64
Cold carcass yield, %	55.61 ^a	57.38 ^b	0.36
Cooling loss, %	1.68	1.66	0.06
Rib eye area, cm ²	41.91	42.79	1.26
Backfat thickness, mm	1.04	1.12	0.03

^{a,b} Literals between columns indicate statistical differences ($P<0.05$).

with a SW around of 400 kg (Juárez *et al.*, 2009). In opposite, Franco *et al.* (2013) reported carcass yields of 50 and 52 % in Gallego de Monte breed horses and their crosses with Hispano-Breton. Furthermore, a carcass yield as low as 47 % was reported 15 month-old Gallego de Monte horses with a SW below 200 kg. As discussed below factors such as the BCS and SW are important to explain carcass yield in horse.

Sex did not affect any characteristic evaluated (Table 3). This finding coinciding with those reported by Sarriés and Beriain (2005) and Lorenzo *et al.* (2013b). These researchers reported that there is no effect of sex, or an interaction with any other factor for carcass characteristics in horses. It is important to note that in our study all males were castrated, which would further minimize any possible difference attributed to gender

The effects of age at slaughter (AS) on carcass characteristics are shown in Table 4. As expected, AS significantly affected ($P<0.05$) carcass characteristics. Increasing AS, linearly increased ($P<0.05$) morphometric measures, compact index, and carcass weight. While cooling loss, REA, and BFT were shown a quadratic effect ($P<0.05$) being maximal values to horses for categories within from >3<15 years. The differences on carcass characteristics by age can be explained by different level of physiological development and by mature size depending of the breed, at greater age, greater morphometric and carcass measures expressed as absolute measures are expected (Sarriés and Beriain, 2005;

Tabla 3. Medias de mínimos cuadrados de las características de canal de caballos Cuarto de Milla según el sexo.

Table 3. Least square means of Quarter Horse carcass characteristics according to sex.

	Sex		MSE
	Males	Females	
N	114 (48.5%)	121 (51.5%)	
Carcass characteristics			
Longitude, cm	129.8	128.9	0.96
Chest depth, cm	77.8	77.5	0.58
Leg length, cm	84.3	83.3	0.61
Leg circumference, cm	98.3	98.7	0.83
Compactness index	1.55	1.55	0.02
Hot carcass weight, kg	211.5	209.6	2.82
Cold carcass weight, kg	205.8	204.0	2.79
Hot carcass yield, %	58.29	58.01	0.49
Cold carcass yield, %	56.62	56.32	0.48
Cooling loss, %	1.68	1.67	0.05
Rib eye area, cm ²	42.19	42.51	0.96
Backfat thickness, mm	1.08	1.08	0.04

^{a,b} Literals between columns indicate statistical differences (P<0.05).

Tabla 4. Medias de mínimos cuadrados de las características de la canal de caballos Cuarto de Milla según la edad.

Table 4. Least square means of Quarter Horse carcass characteristics according to age.

	Age (Years)				SEM
	<3	3 a <8	8 a 15	>15	
N	60 (25.5%)	65 (27.7%)	64 (27.2%)	46 (19.6%)	
Carcass characteristics					
Longitude, cm†	121.17 ^a	130.33 ^b	134.03 ^c	134.04 ^c	1.41
Chest depth, cm†	72.82 ^a	78.67 ^b	79.60 ^b	79.57 ^b	0.88
Leg length, cm†	81.08 ^a	84.33 ^b	85.45 ^b	86.87 ^b	0.98
Leg circumference, cm†	90.71 ^a	99.4 ^b	100.4 ^b	97.6 ^b	1.41
Compactness index†	1.53	1.54	1.55	1.58	0.03
Hot carcass weight, kg†	203.1 ^a	207.8 ^{ab}	213.1 ^{bc}	218.4 ^c	4.21
Cold carcass weight, kg†	197.5 ^a	202.1 ^{ab}	207.4 ^{bc}	212.6 ^c	4.09
Hot carcass yield, %	57.72	57.87	57.39	57.25	0.56
Cold carcass yield, %	56.90	56.30	56.02	56.73	0.71
Cooling loss, % [§]	1.80 ^a	1.64 ^b	1.61 ^b	1.69 ^{ab}	0.05
Rib eye area, cm ^{2§}	40.32 ^{ab}	44.21 ^a	41.35 ^{ab}	36.51 ^b	1.44
Backfat thickness, mm [§]	0.98 ^{ab}	1.12 ^a	1.10 ^a	0.91 ^b	0.04

^{a,b,c} Literals between columns indicate statistical differences (P<0.05).

† Linear component (P<0.05).

§ Quadratic component (P<0.05).

Znamirowska, 2005). In our study, only carcass yield (expressed as %) was not affected by AS. In opposite, Sarriés and Beriain (2005) attributed improvements in carcass yields to age when evaluated carcass yield, when slaughter occurred at 16 and 24 months. It is important to indicate that 16 and 24 months of age is a very early growth period (low maturity level), and could impact carcass yield. It would be necessary to evaluate shorter age ranges and longer periods of growth (i.e. up to 72 months) in order to determine the maximal carcass yield point according to the horses age. In the case of the REA, it does occur in this manner, due to the fact that this show greater values for interim ages, decreasing in horses older than 15 years. Schauer (2015) reported that muscle characteristics in horses increase with age until reaching a peak (this is presented in all mammals species). Likewise, subcutaneous fat (BFT) seems to behave in the same manner decreasing in older animals.

The effects of BCS on carcass characteristics are shown in Table 5. As BCS increased, leg length linearly decreased, but increasing leg circumference enough to raise the compactness index value in horses. Similar than feedlot cattle (Apple *et al.*, 1999; Minchin *et al.*, 2009), as BCS increased, heavier carcass weight, greater REA, and a lower CL were registered. REA are related to rate of weight gain, and rate weight gain is dependent of energy intake (which is correlated with fat deposition (Cunha, 1980). Thus, it is expected that horse that

had better feeding system, greater gain rate and more body fat (and greater BCS), had greater REA values. It is well known that BCS were developed to assess the level of body fat proportion (based on subcutaneous fat index). Therefore, BCS is highly correlated with BFT (Henneke *et al.*, 1983; Gentry *et al.*, 2004).

Body condition score values in this study are lower than those previously reported (Schauer, 2015; Martin-Giménez *et al.*, 2016). As mentioned above, differences between studies can be attributed to differences in production systems (background of feeding and weight at slaughter) and by horse breed. The lower CL in horse with high BCS is explained by lower dehydration by greater fat cover (BFT) in carcass.

The most influential factor in carcass characteristics was SW, since it had a significant effect ($P < 0.05$) on every characteristic evaluated (Table 6). As SW increased, carcass morphometric measurements (length, chest depth, leg length, leg circumference, and compactness index) also increased. Carcass weight (HCW and CCW) show the same behavior, with more pronounced increases ($P < 0.05$). Same behavior appeared in the case of BFT, however, anatomical variations in fat deposition, which could confuse fatness estimates, could be different amongst different horse breeds (Martin-Giménez *et al.*, 2016). Therefore, more ultrasonography studies on different anatomical areas are necessary,

Tabla 5. Medias de mínimos cuadrados de las características de la canal de caballos Cuarto de Milla según la condición corporal.

Table 5. Least square means of Quarter Horse carcass characteristics according to body condition score.

	Body condition score					SEM
	1	2	3	4	5	
N	39 (16.6%)	59 (25.1%)	63(26.8%)	31 (13.2%)	43 (18.3%)	
Carcass characteristics						
Longitude, cm [§]	130.5 ^{ab}	127.4 ^a	127.9 ^a	129.5 ^{ab}	133.2 ^b	1.69
Chest depth, cm [†]	75.98 ^a	75.45 ^a	77.42 ^a	77.56 ^a	80.02 ^b	1.02
Leg length, cm [§]	85.33 ^a	82.19 ^{ab}	84.40 ^{ab}	83.89 ^b	85.94 ^b	0.98
Leg circumference, cm [†]	88.76 ^a	91.33 ^a	98.56 ^b	102.8 ^c	108.1 ^d	1.56
Compactness index [†]	1.27 ^a	1.29 ^a	1.51 ^b	1.63 ^c	1.88 ^d	0.04
Hot carcass weight, kg [†]	172.5 ^a	172.9 ^a	200.8 ^b	218.8 ^b	259.8 ^c	7.54
Cold carcass weight, kg [†]	166.8 ^a	167.8 ^a	195.1 ^b	213.2 ^b	253.7 ^c	7.42
Hot carcass yield, % [†]	52.15 ^a	55.64 ^b	57.29 ^c	56.97 ^c	60.57 ^d	0.62
Cold carcass yield, % [†]	51.83 ^a	55.08 ^b	57.14 ^c	57.17 ^c	59.07 ^d	0.62
Cooling loss, % [†]	1.82 ^a	1.75 ^a	1.72 ^a	1.55 ^b	1.49 ^b	0.06
Rib eye area, cm ² [†]	27.70 ^a	38.45 ^b	44.42 ^c	47.25 ^{cd}	50.68 ^d	1.36
Backfat thickness, mm [†]	0.78 ^a	0.92 ^a	1.11 ^c	1.22 ^{cd}	1.24 ^d	0.08

a,b,c,d Literals between columns indicate statistical differences ($P < 0.05$).

[†] Linear component ($P < 0.05$).

[§] Quadratic component ($P < 0.05$).

Tabla 6. Medias de mínimos cuadrados de las características de la canal de caballos Cuarto de Milla según el peso al sacrificio.
Table 6. Least square means of Quarter Horse carcass characteristics according to slaughter weight.

	Slaughter weight (kg)				SEM
	151-250	251-350	351-450	451-500	
N	28 (11.9%)	72 (30.6%)	93(39.6%)	42 (17.9%)	
Carcass characteristics					
Longitude, cm†	113.7 ^a	127.7 ^b	134.5 ^c	141.5 ^d	1.32
Chest depth, cm†	66.75 ^a	76.29 ^b	80.48 ^c	86.53 ^d	0.77
Leg length, cm†	75.43 ^a	83.36 ^b	87.41 ^c	90.00 ^d	0.88
Leg circumference, cm†	79.48 ^a	92.68 ^b	104.01 ^c	113.82 ^d	1.24
Compactness index†	0.99 ^a	1.32 ^b	1.69 ^c	2.06 ^d	0.03
Hot carcass weight, kg†	116.81 ^a	173.62 ^b	233.34 ^c	299.95 ^d	4.25
Cold carcass weight, kg†	112.6 ^a	168.3 ^b	227.3 ^c	292.81 ^d	4.21
Hot carcass yield, %†	56.20 ^a	56.29 ^a	58.76 ^b	60.56 ^c	0.72
Cold carcass yield, %†	54.17 ^a	54.54 ^a	57.22 ^b	59.10 ^c	0.72
Cooling loss, %†	2.03 ^a	1.75 ^b	1.54 ^c	1.47 ^c	0.06
Rib eye area, cm ² †	32.17 ^a	37.31 ^b	45.62 ^c	52.68 ^d	1.67
Backfat thickness, mm†	0.85 ^a	0.94 ^a	1.13 ^b	1.31 ^b	0.06

^{a,b,c,d} Literals between columns indicate statistical differences (P<0.05).
 † Linear component (P<0.05).

to determine the areas with the greatest tendency for fat deposition of each breed of horses (Quaresma *et al.*, 2013). In the case of CL, it was inversely proportional to SW, that is, the heavier the horse, the lower CL value. As mentioned previously, CL is inversely related to carcass cover fat (BFT). The values of cooling loss registered in this study are consistent with those reported by Franco *et al.* (2013) and Lorenzo *et al.* (2013a), which range between 2 and 3%. But not with Sarriés and Beriain (2005), who reported cooling loss values as large as 13%. Generally, REA size is proportional with body size and degree of body fatness, therefore it is expected that at greater SW greater REA. Although, it is necessary to consider the fact that heavy animals are not necessarily fat and light animals are not necessarily thin either, which would directly affect the REA. Even still, ultrasound measurements for equine muscles are reliable and repeatable (Abe *et al.*, 2012). In feedlot cattle, in which there are countless studies related to factors that affect REA, the production system and nutritional status affect body size and degree of fatness same affecting REA size (Yokoo *et al.*, 2008).

Coefficient determination (R²) between factors and variables registered are shown in Table 7. Origin, sex and age explained very little (R²≤0.20) its effects on carcass characteristics, while SW mainly explained the changes in linear measurements (R²≥0.40) and carcass weight (R²=0.55), while BCS mainly explained carcass yield characteristics (R²=0.27) and REA (R²=0.42). Since these variables are not only affected by the factors assessed (origin, sex, AS, BCS and SW), low R²

Tabla 7. Coeficientes de determinación (R²) para las características de la canal de acuerdo a las variables de llegada al sacrificio.

Table 7. Determination coefficients (R²) for the characteristics of the carcass according to the variables of arrival at slaughter.

Variable	Origin	Sex	Age	BCS	SW	MSE
Carcass characteristics						
Longitude, cm	0.1112	0.0050	0.2082	0.0345	0.5142	0.1269
Chest depth, cm	0.0863	0.0024	0.1329	0.1306	0.5809	0.0669
Leg length, cm	0.0516	0.0163	0.1150	0.0211	0.3983	0.3977
Leg circumference, cm	0.1798	0.0000	0.0419	0.2659	0.5124	0.0000
Hot carcass weight, kg	0.1465	0.0016	0.0700	0.2299	0.5521	0.0000
Compactness index	0.1512	0.0006	0.0437	0.2848	0.5197	0.0000
Cold carcass weight, kg	0.1463	0.0015	0.0691	0.2324	0.5507	0.0000
Hot carcass yield, %	0.1143	0.0000	0.0001	0.2668	0.1747	0.4441
Cold carcass yield, %	0.1238	0.0000	0.0000	0.2852	0.2000	0.3910
Cooling loss, kg	0.0843	0.0032	0.0851	0.0466	0.3653	0.4155
Cooling loss, %	0.0587	0.0004	0.0170	0.1097	0.2021	0.6121
Rib eye area, cm ²	0.1095	0.0003	0.0066	0.4203	0.3439	0.1194
Backfat thickness, mm	0.0858	0.0000	0.0004	0.2147	0.1920	0.5071

BCS: Body condition score; SW: Slaughter weight.

values ($R^2 < 0.50$) can be expected despite the fact that the effect is significant ($P \leq 0.05$). Unlike the factors of origin, sex and age of the horses, factors such as SW and BCS are strongly related, thus, represent greater R^2 values.

CONCLUSION

Origin, sex and age, per se, explained very little its effect on the carcass characteristics. SW mainly explained changes in linear measures and carcass weight, while BCS mainly explained carcass yield and REA.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the owners and staff of the meat packing plant "Empacadora de Carnes de Fresnillo S.A. de C.V.", federal type inspection plant E42, for your support and assistance in carrying out this study.

REFERENCES

- Abe, T., Kearns, C.F. and Rogers, B. 2012. Reliability of ultrasound-measured muscle thickness of the longissimus dorsi muscle in Thoroughbreds. *Wageningen Academic Publishers*. 8(3/4): 189-194. <http://doi.org/10.3920/CEP12015>.
- Apple, J.K., Davis, J.C., Stephenson, J., Hankins, J.E., Davis, J.R. and Beaty, S.L. 1999. Influence of body condition score on carcass characteristics and subprimal yield from cull beef cows. *Journal of Animal Science*. 77(10): 2660-2669. <http://doi.org/10.2527/1999.77102660x>.
- Cunha, T.J. 1980. *Horse feeding and nutrition*. Harcourt Brace Jovanovich Publisher, Academy Press, NY, Pp, 440.
- De Boer, H., Dumont, B.L., Pomeroy, R.W. and Weniger, J.H. 1974. Manual on E.A.P.P. reference methods for the assessment of carcass characteristics in cattle. *Livestock Production Science*. 1: 151-154. [http://doi.org/10.1016/0301-6226\(74\)90055-4](http://doi.org/10.1016/0301-6226(74)90055-4)
- Del Bó, C., Simonetti, P., Gardana, C., Riso, P., Lucchini, G. and Ciappellano, S. 2013. Horse meat consumption affects iron status, lipid profile and fatty acid composition of red blood cells in healthy volunteers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 64(2): 147-54. <http://doi.org/10.3109/09637486.2012.728198>
- FAOSTAT. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. Available in: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL> Accessed: Febrero, 2018. <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Franco, D., Crecente, S., Vázquez, J.A., Gómez, M. and Lorenzo, J.M. 2013. Effect of cross breeding and amount of finishing diet on growth parameters, carcass and meat composition of foals slaughtered at 15 months of age. *Meat Science*. 93(3): 547-556. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.0188>
- Gentry, L.R., Thompson, D.L., Gentry, G.T., Del Vecchio, R.P., Davis, K.A. and Del Vecchio, P.M. 2004. The relationship between body condition score and ultrasonic fat measurements in mare of high versus low body condition. *Journal of Equine Veterinary Science*. 24(5): 198-203. <http://doi.org/10.1016/j.jevs.2004.04.009>
- Gill, C.O. 2005. Safety and storage stability of horse meat for human consumption. *Meat Science*. 71(3): 506-513. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.030>
- Henneke, D.R., Potter, G.D., Kreider, J.L. and Yeates, B.F. 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 15(4): 371-372. <http://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>
- Hintz, H.F. 1995. Thoughts about the history of horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 15(8): 336-339. [http://doi.org/10.1016/S0737-0806\(07\)80536-3](http://doi.org/10.1016/S0737-0806(07)80536-3)
- Juárez, M., Polvillo, O., Gómez, M.D., Alcalde, M.J., Romero, F. and Valera, M. 2009. Breed effect on carcass and meat quality of foals slaughtered at 24 months of age. *Meat Science*. 83(2): 224-228. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.04.022>
- Lanza, M., Landi C., Scerra, M., Galofaro, V. and Pennisi, P. 2009. Meat quality and intramuscular fatty acid composition of Sanfratellano and Haflinger foals. *Meat Science*. 81(1): 142-147. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.07.008>
- Lorenzo, J.M., Fuciños, C., Purriños, L. and Franco, D. 2010. Intramuscular fatty acid composition of "Galician Mountain" foals breed. Effect of sex, slaughtered age and livestock production system. *Meat Science*. 86(3): 825-831. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.07.004>
- Lorenzo, J.M., Pateiro, M. and Franco, D. 2013a. Influence of muscle type on physicochemical and sensory properties of foal meat. *Meat Science*. 94(1): 77-83. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.01.001>
- Lorenzo, J.M., Sarriés, M.V. and Franco, D. 2013b. Sex effect on meat quality and carcass traits of foals slaughtered at 15 months of age. *The Animal Consortium*. 7(7): 1199-1207. <http://doi.org/10.1017/S1751731113000189>
- Martin-Gimenez, T., Aguirre-Pascasio, C.N. and de Blas, I. 2016. Ultrasonographic assessment of regional fat distribution and its relationship with body condition in an easy keeper horse breed. *Journal of Equine Veterinary Science*. 39(C): 69-75. <http://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.01.010>
- Minchin, W., Buckley, F., Kenny, D.A., Keane, M.G., Shalloo, L. and O'Donovan, M. 2009. Prediction of cull cow carcass characteristics from live weight and body condition score measured pre slaughter. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 48(1): 75-86. <http://www.jstor.org/stable/25594965>.
- Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Consulted December 6, 2019, https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015
- Quaresma, M., Payan-Carreira, R. and Silva, S.R. 2013. Relationship between ultrasound measurements of body fat reserves and body condition score in female donkeys. *The Veterinary Journal*. 197(2): 329-334. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.031>
- Richardson, J.D., Cripps, P.J. and Lane J.G. 1995. An evaluation of the accuracy of ageing horses by their dentition: changes of dental morphology with age. *Veterinary Record*. 137(2): 117-121. https://www.dentalage.co.uk/wp-content/uploads/2014/09/Richardson_jd_et_al_1995_horses_teeth.pdf
- Sarriés, M.V. and Beriain, M.J. 2005. Carcass characteristics and meat quality of male and female foals. *Meat Science*. 70(1): 141-152. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.006>
- Schauer, A.L. 2015. Effect of age, breed and sex on longissimus dorsi muscle area subcutaneous fat depth in horses. Honors Scholar Theses.444. University of Connecticut, Department of Animal Science. https://opencommons.uconn.edu/rhonors_theses/444.

Wood, C.H. 1995. Condition scoring for your horse. Agriculture and Natural Resources Publications. https://uknowledge.uky.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1002&context=anr_reports.

Yokoo, M.J., Albuquerque, L.G., Lôbo, R.B., Bezerra, L.A.F., Araujo, F.R.C., Silva, J.A.V. and Sainz, R.D. 2008. Genetic and environmental factor affecting ultrasound measures of

longissimus muscle area and backfat thickness in Nelore cattle. *Livestock Science*. 117(2): 147-154. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.12.006>

Znamirowska, A. 2005. Prediction of horse carcass composition using linear measurements. *Meat Science*. 69(3): 567-570. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.10.0>

Scales removal to improve the appearance and quality of onion

Remoción de capas para mejorar la apariencia y calidad de la cebolla

Barrales-Heredia SM¹, Grimaldo-Juárez O^{1*}, Suárez-Hernández AM², Soto-Ortiz R¹, González-Mendoza D¹, Avendaño-Reyes L¹

¹ Institute of Agricultural Sciences, Autonomous University of Baja California. Carretera a Delta/Oaxaca s/n, Ejido Nuevo León, Valle de Mexicali, Baja California, México.

² Faculty of Engineering and Business San Quintin, Autonomous University of Baja California. Carretera Transpeninsular Km. 180.2, Ejido Padre Kino, San Quintín, Baja California, México.

ABSTRACT

Removal of scales in onion is a common practice in markets to improve product appearance and quality during marketing. The objective of this study was to evaluate the effect of scales removal (C0=without removal, C1=without one scale and C2=without two scales) on physical-chemical quality of onion exposed to environmental conditions for periods of 0, 10, 20 and 30 days. Twelve treatments were evaluated in a completely randomized design. Results showed that dry matter, firmness and color saturation (C*) are not affected by the interaction of exposure time and removal scales. Variables hue angle, luminosity (L*), soluble solids, titratable acidity and pH, showed significant variation with the interaction of exposure time and scales removal level. Variation levels of treatments did not show a defined pattern with the exception of onion color tonality (hue). The hue value increased in the treatments with a higher scales removal, manifesting shades towards green color with the elimination of two scales.

Keywords: scales removal, onion, physical-chemical quality.

RESUMEN

La remoción de capas en la cebolla es una práctica común en mercados para mejorar la apariencia y calidad del producto durante el mercadeo. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la remoción de capas (C0=sin remoción, C1=sin una capa y C2=sin dos capas) sobre la calidad físico-química de la cebolla expuesta a condiciones ambientales por periodos de 0, 10, 20 y 30 días. Se evaluaron 12 tratamientos en un diseño completamente al azar. Los resultados mostraron que las variables materia seca, firmeza y saturación de color (C*) no son afectadas por la interacción de la remoción de capas y tiempo de exposición. Las variables ángulo hue, luminosidad (L*), sólidos solubles, acidez titulable y pH, mostraron variación significativa con la interacción del tiempo de exposición y nivel de remoción de capas. El nivel de variación de los tratamientos no mostró un patrón definido a excepción de la tonalidad de la coloración de la cebolla (hue). El valor de hue se incrementó en los tratamientos con mayor nivel de remoción de capas, manifestándose tonalidades hacia el color verde con la eliminación de dos capas.

Palabras clave: remoción de capas, cebolla, calidad físico-química.

INTRODUCTION

Poor postharvest handling can cause deterioration of vegetables mainly due to bacteria, viruses or harmful parasites (Ramírez *et al.*, 2021), which generate losses that exceed 20% (Castro *et al.*, 2011). In developed countries, losses are between 5% to 30% and occur at retail, foodservice, and consumer sites, while in developing countries the losses are 50% that occur from production to the points of sale (Kader, 2005). Additionally, environmental factors such as temperature, light, air and to a lesser extent the vapor pressure deficit CO₂ enrichment, affect the organoleptic and functional quality of vegetables (Li *et al.*, 2018). In this situation, postharvest treatments are required to maintain quality and extend products shelf life (Kader, 2002).

Onion is a semi-perishable product, which prior to storage requires curing that consists of drying the external scales close to the neck. This dehydration process is carried out in field environmental conditions or it can be artificial with hot air (Cardoso *et al.*, 2016). Onion bulbs are composed of scales arranged according to their chronological age from younger (inner scales) to older (outer scales) (Galsurker *et al.*, 2017). Mature bulb has one to three dry skins that enclose sequential thin external scales, which in turn enclose several swollen internal fleshy scales (Brewster, 2008; Galsurker *et al.*, 2017).

Curing method and storage conditions affect the bulb life span, and consequently the quality (Petropoulos *et al.*, 2017). Storage generates physiological changes that induce postharvest losses and reduce bulb commercial quality (Sohany *et al.*, 2016). Some studies have shown that at temperature storage conditions of 25±3 °C and relative humidity of 75% reduce red onion shelf life, while a temperature between 2.5 and 6 °C has less effect on storage life and postharvest quality (Sohany *et al.*, 2016).

Under this context, biochemical changes during onion deterioration is manifested in content of dry matter, pungency, concentration of abscisic acid and fructans (Ritsema and Smeekens, 2003; Chandrashekar, 2014). Coloration tonality,

*Autor para correspondencia: Onécimo Grimaldo Juárez
Correo electrónico: onecimo.grimaldo@uabc.edu.mx

Recibido: 17 de Noviembre de 2021

Aceptado: 1 de Abril de 2022

concentration of soluble solids (TSS), titratable acidity and pH, are also partially modified parameters (Cardoso *et al.*, 2016). Further, onion distribution to commercial centers and regional markets after storage, generates latency break and progressive bulbs deterioration (Gubb and MacTavish, 2002; Benkeblia and Shiomi, 2004). Consequently, onion useful life in the markets depends on handling conditions (Priya *et al.*, 2014).

At the point of sale, the onions are exposed without the outer scales for days or weeks. The scales removal practice is used with the purpose of improving appearance and attract buyers (Hasan and Uddin, 2011). The removal of onion scales is carried out to a greater extent (85% a 100% of farmers) when they present symptoms of aging or undesirable aspects due to the incidence of some pathogen, or remove the loose outer skin from their onions before selling (Adnan *et al.*, 2014).

Physical damage to bulbs and exposure to high temperatures increases respiratory rate (Galsurker *et al.*, 2018). This process demands consumption of organic compounds, generating changes in TSS balance, titratable acidity and pH, in addition to other physical changes such as coloration and dry matter (Chandrashekar, 2014). However, there are not enough studies to determine the effect of scales removal in onion bulbs during market exposure. Therefore, the aim of this research was to evaluate the effect of removing one and two scales on quality of onions exposed to market environmental conditions (temperature of 25 ± 5 °C and relative humidity of 60% to 80%) for a period of 30 days.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in the postharvest physiology laboratory of the institute of Agricultural Sciences of the Autonomous University of Baja California, Mexico, in September 2020. White onion cv "Carta Blanca" (*Allium cepa* L.) has provided by company San Gabriel, Valle de Ojos Negros, Baja California, Mexico. The onion cultivar "Carta Blanca" has a short-day photoperiod with a white bulb, round shape and is tolerant to flowering. Bulbs were harvested in July 2020, dried in the field for one week, trimmed of leaves and roots, and subsequently stored for 2 months. During storage, onions were at 20 ± 5 °C with a 60–70% relative humidity (RH). The onions samples for the study were uniform in appearance and size (7.00 ± 0.50 cm of equatorial diameter and 8.00 ± 0.50 cm of polar diameter).

The evaluation of onion quality was carried out in 240 bulbs under a completely randomized design with a 3×4 factorial arrangement. Twelve treatments were evaluated that resulted from the combination of scales removal levels (C0=without removal, C1=without one scale and C2=without two scales) and exposure periods (0, 10, 20 and 30 days). Twenty repetitions per treatment and one bulb per experimental unit were considered. The bulbs were exposed to environmental conditions with an average temperature of 25 ± 5 °C and RH of $70\pm 10\%$.

The variables evaluated were dry matter (%), firmness

(N), color (L^* , C^* y hue), total soluble solids (°Brix), titratable acidity (%) and hydrogen potential (pH). Dry matter was determined by oven drying method (AOAC, 1998), where a sample of 10 g per bulb was taken. Firmness was quantified with a Chatillon DFE-100 digital force gauge (AETEK Inc, USA), with an 8 mm cylindrical strut that was introduced 3 times in the onions at the equatorial part. An X-Rite SP-62 sphere spectrophotometer (X-Rite Inc., USA) was used to determine the color, in the two opposite parts of the equatorial section of each bulb by treatment. The values expressed were L^* (Luminosity) that defines color clarity, C^* (chroma) indicates color saturation and hue angle (°) that indicates angle tone.

Parameters of pH, titratable acidity (TA) and total soluble solids (TSS) were determined using methodologies proposed by AOAC (1975, 1998). For this, 10 g of fresh plant tissue were used and homogenized in a commercial blender (Osterizer brand) with 50 mL of distilled water (pH=7.0). Subsequently, the extract was filtered through a strainer and the pH was recorded with a multiparametric benchtop meter model H12550-01. For titratable acidity determination, a 10 mL aliquot of extract was taken and 2 to 3 drops of phenolphthalein (Merck brand) were added, adding 0.1 N NaOH solution (Merck brand) until achieving neutralization of acids present in the sample, reporting the result in percent citric acid. The TSS concentration was determined in a drop of extract placed on an Abbe Leika Mark II digital refractometer previously calibrated with distilled water.

Data were analyzed using a factorial arrangement under a completely randomized design, which included the scales removal (C0, C1 y C2) and exposure periods (0, 10, 20 and 30 days) factors. The analysis of variance was performed using the MIXED procedure and the REPEATED option of SAS software ver. 9.1 (SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2006). The comparison of means was carried out utilizing the Tukey test at $P \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Onion postharvest quality with removal of one (C1) and two (C2) scales and without removal (C0) exposed to environmental conditions (25 ± 5 °C and RH $70\pm 10\%$) for a period of 30 days are presented in table 1. These results show that dry matter was not affected ($p < 0.05$) by scale removal level (C0, C1 and C2), exposure time (0, 10, 20 and 30 d), or both factors interaction. Recorded values varied between 8.72% and 11.17% (Figure 1).

In cv. Sunpower onions with high storage capacity there is a slow reduction of dry matter during storage at 22 ± 1 °C and relative humidity of $70\pm 10\%$ (Sharma *et al.*, 2015). These variations in dry matter content in stored onions are considered to be mainly associated with physiological changes, such as latency braking and internal sprouting, rather than to effect of storage time and temperature (Sharma and Lee, 2016). According to Sharma *et al.* (2014), post-storage deterioration of Sunpower onions (high storage capacity variety) begins at four weeks under ambient conditions (20 to 25 °C

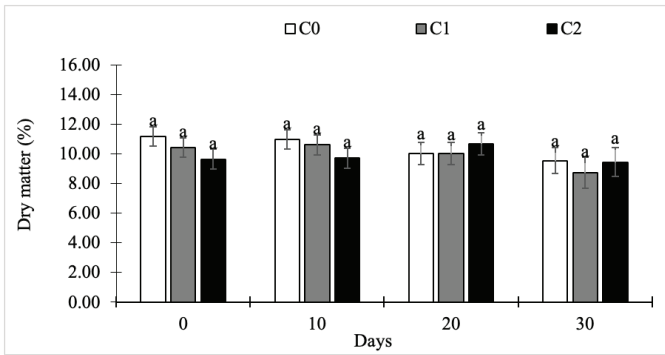


Figure 1. Onion dry matter without removal of scales (C0), without one scale (C1) and without two scales (C2) at 0, 10, 20 and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25±5 °C and relative humidity of 70±10%).

Figura 1. Porcentaje de materia seca de cebolla sin remoción de capas (C0), sin una capa (C1) y sin dos capas (C2) durante 0, 10, 20 y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25±5 °C y humedad relativa de 70±10%).

Table 1. Analysis of variance of onion quality parameters at different degrees of scales removal and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25±5 °C and relative humidity of 70±10%).

Tabla 1. Análisis de varianza de los parámetros de calidad de cebolla a diferentes niveles de remoción de capas y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25±5 °C y humedad relativa de 70±10%).

Source Variance	DF	Square means and significance			
		DM	F	C	L
Scale removal (C)	2	5.003 ^{ns}	52.186 ^{ns}	54.682 ^{ns}	18.579 ^{ns}
Days of exposure(D)	3	8.641 ^{ns}	146.249 ^{**}	92.007 ^{**}	77.199 [*]
CxD	6	4.638 ^{ns}	57.482 ^{ns}	38.065 ^{ns}	138.253 ^{***}
Error	171	4.204	33.142	22.366	22.887
Total	182				
CV(%)		20.024	15.895	44.319	5.673

Source Variance	DF	Square means and significance			
		h°	TSS	TA	pH
Scale removal (C)	2	2216.610 ^{***}	7.385 [*]	0.000 ^{ns}	0.181 ^{***}
Days (D)	3	59.528 ^{ns}	2.769 ^{ns}	0.104 ^{***}	0.731 ^{***}
CxD	6	118.422 [*]	5.446 [*]	0.003 ^{**}	0.112 ^{***}
Error	171	41.731	2.098	0.000	0.014
Total	182				
CV(%)		6.761	16.448	27.103	2.051

DF: degrees of freedom; DM: dry matter; F: Firmness (N); C*: chromaticity, L*: luminosity; h°: angle hue; TSS: Total soluble solids; TA: titratable acidity; pH: hydrogenation potential. ns: non-significant values; Significant differences: *p-value<0.05, **p-value<0.01 and ***p-value<0.001.

and RH 60–80%), with a subsequent cold storage (0±1 °C and HR 70–75%) period of 8 months.

Onion firmness was a characteristic not affected by C0, C1 and C2 (p>0.05), as was the interaction of scale removal level and exposure periods (p>0.05) (Table 1). However, when the exposure periods were independently compared, a 5.77% reduction in firmness was observed after 10 days of the onions exposure (Figure 2).

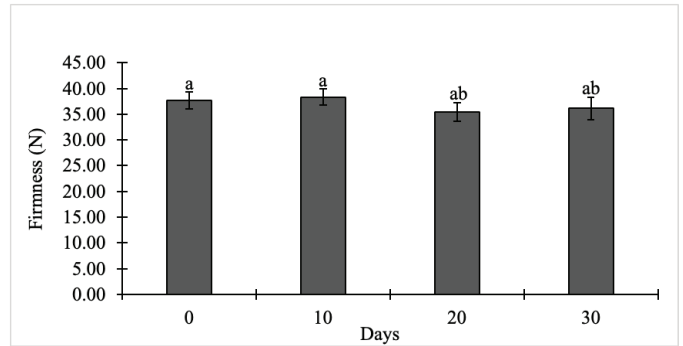


Figure 2. Onion firmness at 0, 10, 20 and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25±5 °C and relative humidity of 70±10%).

Figura 2. Firmeza de cebolla durante 0, 10, 20 y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25±5 °C y humedad relativa de 70±10%).

Scale removal and exposure period were expected to have an effect on the onion dehydration firmness; but, the 30 days of exposure were not enough to significantly alter this attribute. Coolong *et al.* (2008) observed that in some onion cultivars the progressive loss of firmness occurs after four weeks of storage at 6.6 ±1.4 °C and HR 82±4.2%, while in other varieties is after eight weeks. Melo *et al.* (2012) point out that Optima variety increases in bulb firmness as the loss of weight increases during the 50 days of exposure to a temperature of 5 °C and relative humidity of 60%. However, this effect may vary depending on the variety. Islam *et al.* (2019) report a loss of firmness at 60 days after storage in different varieties. Variations in onion firmness are considered to be the result of genotype, storage time and exposed temperature interaction (Petropoulos *et al.*, 2016).

Chromaticity in the bulb's coloration is an attribute that does not vary due to scale removal level, nor to interaction effect of said factor with exposure time (Table 1). However, the Chroma (C*) value was altered by exposure time (p<0.01) at ambient conditions (25±5 °C and RH 70±10%). The chroma value remained stable between 9.3 and 10.7 in the first 20 days of exposure, while, at 30 days it increased significantly by 48.98% with respect to the value registered at 20 days (Figure 3). This increase indicates that the onion color changed

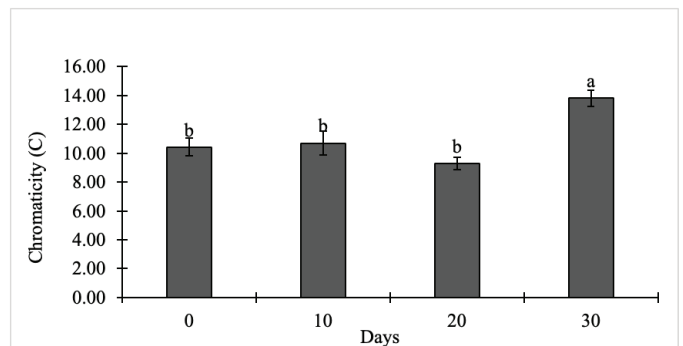


Figure 3. Onion chromaticity at 0, 10, 20 and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25±5 °C and relative humidity of 70±10%).

Figura 3. Cromaticidad durante 0, 10, 20 y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25±5 °C y humedad relativa de 70±10%).

from opaque to a more saturated. Berno *et al.* (2014) reported an increase in chroma value 15 days after storing minimally processed purple onions at a temperature of 0 °C. However, saturation value (C*) depends on the variety (Petropoulos *et al.*, 2015) and position of the scales (Galsurker *et al.*, 2017).

The luminosity expressed in values from 1 to 100, where 1 is dark and 100 light, it was found that the bulbs presented values from 82.41 to 88.15 in a period of 30 days (Figure 4). The bulbs response with and without scales did not show differences either at the beginning (0 days) or the end (30 days) of the sampling. The average value registered in treatments at the beginning of experiment was 83.29 and at the end it increased 3.30% ($L = 86.04$). These differences between the values indicate that the onions are less shiny at the beginning and after a period of 30 days, they become shinier. In the intermediate sampling periods (10 and 20 days) of exposure, it was found that removal of two scales (C2) significantly affected brightness compared to the other treatments. This response was because C2 went from a hydrated condition at the beginning, to a dehydrated one in the next 10 days, giving appearance of a dark white color. Subsequently after 20 days, brilliance in C2 was significantly increased with respect to the other treatments. The onion condition with scales (C0) and without scales (C1), although they registered lower brightness at 20 days, the values were similar in the evaluated periods, which indicate stability in color clarity compared to C2.

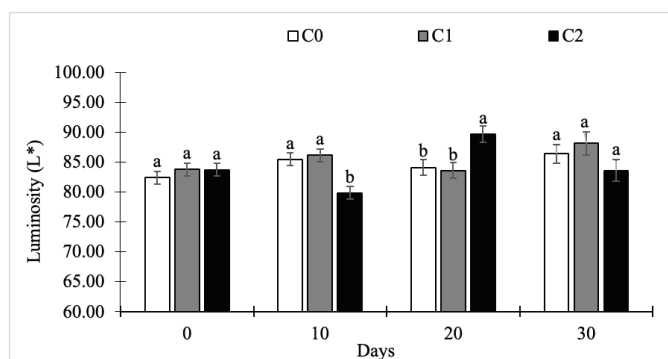


Figure 4. Onion lightness without removal of scales (C0), without a scale (C1) and without two scales (C2) at 0, 10, 20 and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25 ± 5 °C and relative humidity of $70 \pm 10\%$).

Figura 4. Luminosidad de la coloración de cebolla sin remoción de capas (C0), sin una capa (C1) y sin dos capas (C2) durante 0, 10, 20 y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25 ± 5 °C y humedad relativa de $70 \pm 10\%$).

The onion brilliance is related to variety and storage conditions. Ríos-González *et al.* (2018), pointed out that Sierra Blanca variety registers values from 93.92 to 98.91, while Bola Precoce variety presents values of 67.26 (Cardoso *et al.*, 2016). In the present investigation, results obtained were intermediate and ranged from 82.15 to 88.15 between treatments. Onion stability brightness during storage is a trend that has been found when using controlled atmospheres for periods of up to 7 months (Ríos-González *et al.*, 2018). In another stu-

dy, it was found that luminosity increases in Beta Cristal and Optima varieties, when stored at a temperature of 5 °C and humidity of 85% (Melo *et al.*, 2012). It has also been reported that in the Bola Precoce variety, the external luminosity remained without significant difference with values between 59.86 and 61.88, when stored in silo at 30 °C for 14 days (Rego *et al.*, 2019).

The onion coloration based on values obtained from the hue angle was yellow (84.31 to 103.39 h°) in the different treatments during the 30 days of exposure (Figure 5). The values recorded without removal of scales (C0) were statistically the lowest (84.31 to 93.65), which is interpreted as a yellow hue with a slight orange hue. Bulbs without one (C1) and two scales (C2), presented hue values statistically higher than C0. Yellow coloration of bulbs C1 was higher (96.35 to 98.02), in comparison with C2 (99.19 to 101.91), where the yellow hue is reduced towards a green hue. The pattern of variation between the treatments within each evaluated period was consistent, showing an increase in the hue angle with respect to removal scales level.

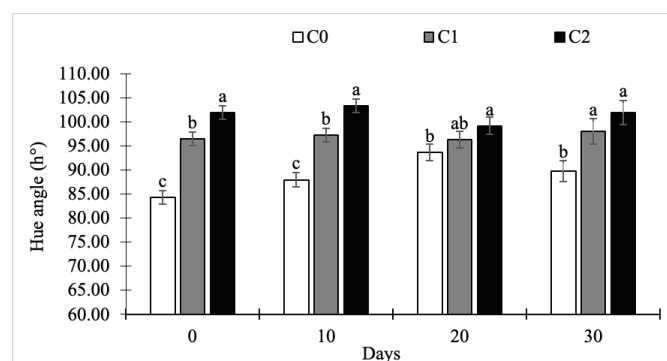


Figure 5. Onion hue angle without removal of scales (C0), without a scale (C1) and without two scales (C2) at 0, 10, 20 and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25 ± 5 °C and relative humidity of $70 \pm 10\%$).

Figura 5. Tonalidad de la coloración de cebolla sin remoción de capas (C0), sin una capa (C1) y sin dos capas (C2) durante 0, 10, 20 y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25 ± 5 °C y humedad relativa de $70 \pm 10\%$).

According to Sharma and Lee (2016), the presence of yellowish-orange tones in onions that preserve scales, is caused by transformation of quercetin glucosides during the formation of dry skin. Grzelak *et al.* (2009) mention that the quercetin glucosides content in onion is high, and remains constant during storage. However, since they are mainly found in the outer scales (Lee and Mitchell, 2011), their total removal results in a loss of approximately 50% of polyphenols (Grzelak *et al.*, 2009) when trying to improve the bulb appearance. The exposure of bulbs without external scales to light during marketing, generates greening because they lack the protective layer generated in curing (Grzelak *et al.*, 2009).

Content of total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA) and pH, were significantly modified ($P \leq 0.05$) when combining the scales removal level and exposure time (Table

1). Concentration of soluble solids varied from 7.69 to 9.51 °Brix (Figure 6). The onion that kept all the scales (C0) showed the highest concentration of TSS in each exposure period. Treatment without one scale (C1) presented a more stable behavior (8.33 to 8.98 °Brix) in comparison to C0 onions (8.84 to 9.74 °Brix), with similar values between both in the period of 10 and 20 d. At the end of the experiment (30 d), TSS concentration in C1 was reduced by 2.29% in relation to bulbs at 0 days. Onions without two scales (C2) registered a lower percentage of solids during the first two evaluation periods, with values of 8.15 (0 d) and 7.69 (10 d), but later, values were similar to bulbs C0 at days 20 and 30.

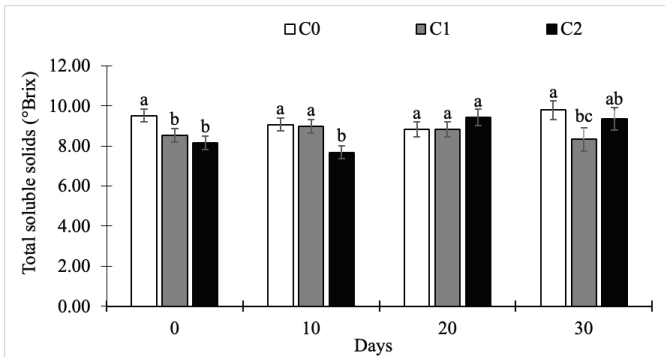


Figure 6. Onion total soluble solids without removal of scales (C0), without a scale (C1) and without two scales (C2) at 0, 10, 20 and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25 ± 5 °C and relative humidity of $70\pm 10\%$).

Figura 6. Contenido de sólidos solubles en cebolla sin remoción de capas (C0), sin una capa (C1) y sin dos capas (C2) durante 0, 10, 20 y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25 ± 5 °C y humedad relativa de $70\pm 10\%$).

Titrateable acidity of onions during the evaluated period was variable between the different scale removal levels (Figure 7). Acidity values remained low (0.079) at 0 and 10 days, at 20 days they increased (0.178) and finally decreased again at 30 days (0.084). In comparison within the treatments, the greatest contrast was presented at 10 and 30 days after

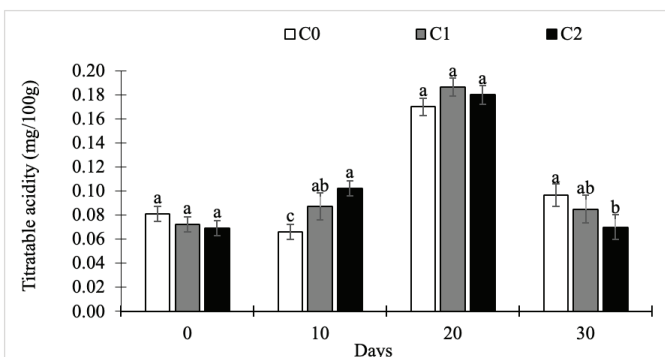


Figure 7. Onion titrateable acidity without removal of scales (C0), without one scale (C1) and without two scales (C2) at 0, 10, 20 and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25 ± 5 °C and relative humidity of $70\pm 10\%$).

Figura 7. Acidez titulable de cebolla sin remoción de capas (C0), sin una capa (C1) y sin dos capas (C2) durante 0, 10, 20 y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25 ± 5 °C y humedad relativa de $70\pm 10\%$).

the onions were placed. At 10 days, titrateable acidity increased with scales removal level, while at 30 d the relationship was inverse, registering the lowest acidity in condition of onions without two scales.

The quantification of pH between treatments, registered variations from 5.25 to 5.82 during the 30 days of exposure (Figure 8). The lowest pH was recorded in onions without two scales (C2) at 30 days. Treatments that conserved all the scales (C0) and without one scale (C1), presented a similar pattern of pH variation during the days of exposure, with the exception of values recorded after 10 days, where value was lower in condition C0. The pH in bulbs C2 remained unchanged at 10 days, subsequently it increased by 1.7% at 20 days and at the end of the period (30 d), the lowest value was recorded of 8.11%.

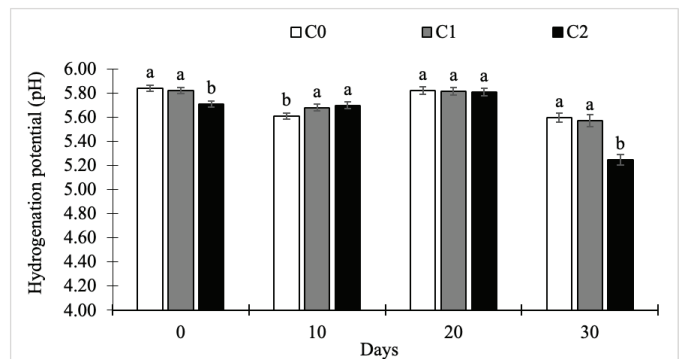


Figure 8. Onion hydrogenation potential without removal of scales (C0), without one scale (C1) and without two scales (C2) at 0, 10, 20 and 30 days of exposure to environmental conditions (temperature of 25 ± 5 °C and relative humidity of $70\pm 10\%$).

Figura 8. pH de cebolla sin remoción de capas (C0), sin una capa (C1) y sin dos capas (C2) durante 0, 10, 20 y 30 días de exposición a condiciones ambientales (temperatura de 25 ± 5 °C y humedad relativa de $70\pm 10\%$).

General behavior of soluble solids content, titrateable acidity and pH in onion with different degrees of scales removal and storage periods, includes high and low values but presenting statistical differences only in some periods. Studies carried out by Petropoulos *et al.* (2016) indicate that the soluble solids in the bulb of different varieties do not show a specific trend after storing onion at temperatures of 5 and 25 °C for 147 days. Melo *et al.* (2012) found that in onions Beta Cristal and Optima varieties, the content of titrateable acidity presents ups and downs when stored at a temperature of 5 °C. This behavior was also found in minimally processed onions stored at temperatures of 0 and 5 °C (Berno *et al.*, 2014).

Statistical variations of the variables TSS, TA and pH in treatments within some periods of exposure are considered to be the result of scales exposed during the experiment. Galsurker *et al.* (2018) pointed out different biological responses of onion according to scales exposed during thermal stress. Additionally, in aging process, the exposed scales present morphological and transcriptional changes (Galsurker *et al.*, 2017), which also contributes to changes observed in applied treatments.

Variations of lower TSS concentration in onions without one (C1) and two (C2) scales with respect to those without removal (C0), is attributed to the increase in respiration due to mechanical damage caused by removing scales. Islam *et al.* (2019) found that Bartio, Hylander and Summit varieties increase respiration rate during storage, while reports on Orlando variety, show that respiration rate increases significantly in bulbs without four scales compared to onions with outer layer, when exposed to temperatures of 33 °C for a period of 8 days (Galsurker *et al.*, 2018). Elimination of impermeable layer developed in the curing of onions, generates sensitivity to environmental factors and consequently produces greater activity of catabolism of substrates, mainly carbohydrates and other phytochemicals (Rutherford and White, 1982; Mogren *et al.*, 2007a, 2007b).

In a study carried out by Rodríguez *et al.* (2008) on the content of organic acids in six onion cultivars, pH values of 5.47 to 5.67 were found, similar to those obtained in this work, except for C2 at 30 days. Marinozzi *et al.* (2014) and Petropoulos *et al.* (2015) reported values between 5.40 and 5.90 in different onion cultivars. However, pH value also depends on genotype, storage time and temperature interaction (Petropoulos *et al.*, 2016).

CONCLUSION

Removal of one or two outer scales does not modify the dry matter content and bulb firmness during an exposure period of 30 days under ambient conditions (25±5 °C and RH 60% - 80%). This favors outer scales elimination to improve onion appearance during market exhibition. However, scales removal induces changes in appearance (shade and brightness) and biochemical quality of the onion. The similarity of quality in soluble solids content, titratable acidity and pH between bulbs with all the scales and without one scale, determines that elimination of one scale is an alternative to improve appearance, when it is required to eliminate traces of scale damaged by handling and storage periods. However, in subsequent investigations it is necessary to evaluate onion quality due to scale removal effect, considering environmental conditions and exposure period of 30 days, as well as onion previous storage conditions to be used in the study.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Institute of Agricultural Sciences, Autonomous University of Baja California, Baja California, Mexico for the support received for the present investigation.

REFERENCES

- Adnan, K. M., Rahman, M. M., & Sarker, S. A. 2014. Marketing channels and post harvest practices of onion: a case of Bogra and Joypurhat District in Bangladesh. *Universal Journal of Agricultural Research*. 2: 61-66.
- AOAC. 1975. *Official Methods of Analysis*. 12th ed. Association of official analytical Chemists. Washington, D.C.
- AOAC. 1998. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of official analytical Chemists. Guithersburg, USA.
- Benkeblia, N. and Shiomi, N. 2004. Chilling effect on soluble sugars, respiration rate, total phenolics, peroxidase activity and dormancy of onion bulbs. *Scientia Agricola*. 61: 281-285.
- Berno, N.D., Tezotto-Uliana, J.V., dos Santos, D.C.T. and Kluge, R.A. 2014. Storage temperature and type of cut affect the biochemical and physiological characteristics of fresh-cut purple onions. *Postharvest Biology and Technology*. 93: 91-96.
- Brewster, J.L. 2008. *Onions and Other Vegetable Alliums*; CABI Publishing: Wallingford, UK.
- Cardoso, D.S.C.P., Pereira, A.M., Correia, T.D. and Finger, F.L. 2016. Drying time and post-harvest quality of onion bulbs submitted to artificial curing. *Revista Ceres*. 63: 822-828.
- Castro, A.A., Pimentel, J.D.R., Souza, D.S., Oliveira, T.V.D. and Oliveira, M.D.C. 2011. Estudio de la conservación de la papaya (*Carica papaya* L.) asociado a la aplicación de películas comestibles. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2: 049-060.
- Chandrashekar, S.Y. 2014. Physio-chemical changes during postharvest handling of onion (*Allium cepa* L.)-A review. *Agricultural Reviews*. 35: 225-232.
- Coolong, T.W., Randle, W.M. and Wicker, L. 2008. Structural and chemical differences in the cell wall regions in relation to scale firmness of three onion (*Allium cepa* L.) selections at harvest and during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88: 1277-1286.
- Galsurker, O., Doron-Faigenboim, A., Teper-Bamnlker, P., Daus, A., Lers, A. and Eshel, D. 2018. Differential response to heat stress in outer and inner onion bulb scales. *Journal of Experimental Botany*. 69: 4047-4064.
- Galsurker, O., Doron-Faigenboim, A., Teper-Bamnlker, P., Daus, A., Fridman, Y., Lers, A. and Eshel, D. 2017. Cellular and molecular changes associated with onion skin formation suggest involvement of programmed cell death. *Front. Plant Sciences*. 7: 2031.
- Grzelak, K., Milala, J., Król, B., Adamicki, F. and Badelek, E. 2009. Content of quercetin glycosides and fructooligosaccharides in onion stored in a cold room. *European Food Research and Technology*. 228: 1001-1007.
- Gubb, I.R. and MacTavish, H.S. 2002. Onion pre-and post-harvest considerations. In: *Allium crop science: recent advances Vol 3*. H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (Ed.), pp 233-266. CRC Press, Florida, USA.
- Hasan, M. K., & Uddin, M. Z. 2011. Marketing and Post-Harvest Practices of Onion in Some Selected Areas of Bangladesh. *Journal Agroforestry Environment* 5: 67-72.
- Islam, M.N., Wang, A., Pedersen, J.S., Sorensen, J.N., Korner, O. and Edelenbos, M. 2019. Online measurement of temperature and relative humidity as marker tools for quality changes in onion bulbs during storage. *PLoS One*. 14: e0210577.
- Kader, A.A. 2002. Postharvest biology and technology: an overview. In: *Postharvest technology of horticultural crops 3rd ed.* A.A. Kader (ed.), pp. 39-47. University California Agriculture and Natural Resources, California, USA.
- Kader, A.A. 2005. Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce. *Acta Horticulturae*. 682: 2169-2176.
- Lee, J. and Mitchell, A.E. 2011. Quercetin and isorhamnetin glycosides in onion (*Allium cepa* L.): varietal comparison, physical distribution, coproduct evaluation, and long-term storage stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 857-863.
- Li, D., Zhu, Z. and Sun, D. 2018. Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 75: 47-55.

- Marinozzi, M., Sardella, R., Scorzoni, S., Ianni, F., Lisanti, A. and Natalini, B. 2014. Validated pungency assessment of three Italian onion (*Allium cepa* L.) cultivars. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture and Food*. 2: 532-541.
- Melo, C.O., Moretti, C.L., Machado, C.M.M., Mattos, L.M. and Muniz, L.B. 2012. Alterações físicas e químicas em cebolas armazenadas sob refrigeração. *Ciência Rural*. 42: 2078-2084.
- Mogren, L.M., Olsson, M.E. and Gertsson, U.E. 2007a. Effects of cultivar, lifting time and nitrogen fertiliser level on quercetin content in onion (*Allium cepa* L.) at lifting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 470-476.
- Mogren, L.M., Olsson, M.E. and Gertsson, U.E. 2007b. Quercetin content in stored onions (*Allium cepa* L.): effects of storage conditions, cultivar, lifting time and nitrogen fertilizer level. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 1595-1602.
- Petropoulos, S.A., Ntatsi, G. and Ferreira, I.C.F.R. 2017. Long-term storage of onion and the factors that affect its quality: A critical review. *Food Reviews International*. 33: 62-83.
- Petropoulos, S.A., Fernandes, A., Barros, L., Cerreira, F.I. and Ntatsi, G. 2015. Morphological, nutritional and chemical description of "Vatikiotiko", an onion local landrace from Greece. *Food Chemistry*. 182: 156-163.
- Petropoulos, S.A., Ntatsi, G., Fernandes, A., Barros, L., Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C. and Antoniadis, V. 2016. Long-term storage effect on chemical composition, nutritional value and quality of Greek onion landrace "Vatikiotiko". *Food Chemistry*. 201: 168-176.
- Priya, E.P., Sinja, V.R., Alice, R.P.J.S., Shanmugasundaram, S. and Alagusundaram, K. 2014. Storage of onions—a review. *Agricultural Reviews*. 35: 239-249.
- Ramírez, J.A., Castañón-Rodríguez, J.F. and Uresti-Marín, R.M. 2021. An exploratory study of possible food waste risks in supermarket fruit and vegetable sections. *Food Science and Technology*. 41:967-973.
- Rego, E.R., Ferreira, A.P.S., Pereira, D.M., Pereira, A.M., Pereira, O.L. and Finger, F.L. 2019. Artificially cooling of onion bulbs stored in brickworkpatterned vertical silos. *Horticultura Brasileira*. 37: 234-238.
- Ríos-González, I.J., Guevara-Aguilar, A., Sida-Arreola, J.P., Sánchez, E., Ronquillo-Aboite, J.O., Alvarado-González, M. and Chávez-Mendoza, C. 2018. Effect of controlled atmospheres on the quality of white onion (*Allium cepa* L.). *Journal Food Science and Technology*. 55: 3564-3574.
- Ritsema, T. and Smeekens, S. 2003. Fructans: Beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant Biology*. 6: 223-230.
- Rodríguez, G.B., Tascon, R.C., Rodríguez, E.R. and Romero, C.D. 2008. Organic acid contents in onion cultivars (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 6512-6519.
- Rutherford, P.P. and Whittle, R. 1982. The carbohydrate composition of onions during long term cold storage. *Journal of Horticultural Sciences*. 57:349-356.
- SAS. Institute Inc. 2006. The SAS System for Windows release 9.1. (TS MO) AIX, USA.
- Sharma, K., Assefa, A.D., Kim, S., Ko, E.Y. and Park S.W. 2014. Change in chemical composition of onion (*Allium cepa* L. cv. Sunpower) during post-storage under ambient conditions. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 42: 87-98.
- Sharma, K., Awraris, A., Ko, E.S., Lee, E.-T. and Park, S.W. 2015. Quantitative analysis of flavonoids, sugars, phenylalanine and tryptophan in onion scales during storage under ambient conditions. *Journal Food Science and Technology*. 52: 2157-2165.
- Sharma, K. and Lee, Y.R. 2016. Effect of different storage temperature on chemical composition of onion (*Allium cepa* L.) and its enzymes. *Journal Food Science and Technology*. 53: 1620-1632.
- Sohany, M., Sarker, M. and Mahomud, M. 2016. Physiological changes in red onion bulbs at different storage temperature. *World Journal of Engineering and Technology*. 4: 261-266.

Rendimiento y valor nutritivo de cereales y cártamo forrajero en la Comarca Lagunera

Yield and nutritional value of cereals and safflower forage in the Comarca Lagunera

Ochoa-Espinoza XM¹, Reta-Sánchez DG^{2*}, Cano-Ríos P³, Sánchez-Duarte JI², Ochoa-Martínez E², García-Martínez JE⁴, Reyes-González A², Quiroga-Garza HM⁵

¹ Campo Experimental Norman E. Borlaug. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Calle Dr. Norman E. Borlaug km. 12, Col. Valle del Yaqui, CP 85000, Cd. Obregón, Sonora, México.

² Campo Experimental Delicias. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 2 Carretera Delicias-Rosales. CP 33000. Centro, Cd. Delicias, Chihuahua, México.

³ Campo Experimental La Laguna. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard José Santos Valdez 1200 pte. CP 27440. Matamoros, Coahuila, México.

⁴ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calz. Antonio Narro 1923, Buenavista. C.P. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

⁵ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Unidad Laguna. Carretera a Santa Fé y Periférico Raúl López Sánchez s/n. Col. Valle Verde. CP 27054. Torreón, Coahuila, México.

ABSTRACT

Safflower and cereals sowing as an alternative to oat allow to increase the forage potential in late sowings during fall-winter season. The objective of the study was to compare the forage potential and nutritive value of cereals and safflower with those observed in oat late sowings during fall-winter season. The study was conducted during the fall-winter season of 2017-2018 and 2018-2019 in Matamoros, Coahuila, Mexico. Cultivars of oat, barley, wheat, triticale and safflower with or without spines were evaluated. A randomized complete block design with four replications was used. Forage nutritive value, dry matter (DM) and nutrients yields were determined. Late sowing of barley and wheat increased the forage potential with or without incidence of foliar disease in oat. The increments reached from 26.3 % to 39 % in DM yields, 34.8% in Crude protein yields, 34.2 % in net energy for lactation yields and 29.4 % to 34.8 % in digestible DM yield. The species triticale, wheat, barley and spineless safflower also were good alternatives, but only when dry forage yields were reduced by foliar diseases. The forage potential may be increased using alternative species to oat in late sowings of fall-winter season.

Key words: Dry matter; crude protein; fiber; digestibility; foliar diseases.

RESUMEN

El cártamo y los cereales como alternativas a la avena permiten incrementar el potencial forrajero en siembras tardías de otoño-invierno. El objetivo del estudio fue comparar el potencial forrajero y el valor nutritivo de cereales y cártamos con y sin espinas con los observados en avena en siembras tardías de otoño-invierno. El estudio se realizó en los ciclos otoño-invierno de 2017-2018 y 2018-2019 en Matamoros, Coahuila, México. Se evaluaron cultivares de avena, cebada, trigo, triticale y cártamos con y sin espinas. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones.

Se determinó el valor nutritivo del forraje y los rendimientos de nutrientes. La cebada y el trigo aumentaron el potencial forrajero con la incidencia o no de enfermedades foliares en avena. Los incrementos fueron en producción de materia seca (MS) (26.3 a 39.0 %), proteína cruda (34.8 %), energía neta para lactancia (34.2 %) y MS digestible (29.4 a 34.8 %). Las especies triticale, trigo, cebada y cártamo también fueron buenas alternativas, pero sólo cuando los rendimientos de forraje en avena fueron reducidos por enfermedades foliares. El potencial forrajero puede incrementarse con especies alternativas a la avena en siembras tardías de otoño-invierno. **Palabras claves:** Materia seca; proteína cruda; fibra; digestibilidad; enfermedades foliares.

INTRODUCCIÓN

En 2020, la producción de leche de vaca en México fue de 12'564,000 millones de litros, de los cuales 20.51 % se produjo en los sistemas de producción especializados de la Comarca Lagunera (SIAP, 2021). En esta región, los principales patrones de forrajes usados para alimentar el ganado están compuestos de maíz y/o sorgo en primavera o verano y avena en otoño-invierno (Sánchez *et al.*, 2018). Uno de los principales problemas para producir estos forrajes es la escasez de agua para riego (Reta *et al.*, 2017b). Además, la producción de forrajes, sobre todo durante la primavera y el verano, está siendo afectada por los efectos del cambio climático como la elevada temperatura y por los periodos de sequía prolongados (Sanderson *et al.*, 2011). Esta situación se agravará en las próximas décadas. Por lo tanto, es necesario encontrar especies forrajeras alternativas como cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) sin espinas, triticale, cebada y trigo que ayuden a sostener la producción de leche bajo las condiciones limitadas de agua de riego en un futuro en el norte-centro de México.

Una alternativa para incrementar el potencial forrajero en la región es la siembra de cártamo en siembras tardías,

como cultivo con características apropiadas para regiones áridas y semiáridas con limitada disponibilidad de agua (Bar-Tal *et al.*, 2008; Leshem *et al.*, 2000), y con moderada tolerancia a la salinidad (Maas *et al.*, 1986). Otra alternativa es la siembra de cereales forrajeros alternativos como triticale, cebada y trigo; los cuales tienen mayor tolerancia a bajas temperaturas (Snyder y Melo-Abreu, 2005) y salinidad (Santamaría *et al.*, 2006) que la avena. Además, en comparación con avena, estos cultivos no han mostrado daños por enfermedades foliares en siembras tardías en esta región (Reta *et al.*, 2018). El objetivo de este estudio fue comparar el potencial forrajero y la composición nutritiva de cereales de grano pequeño y cártamos con y sin espinas con los observados en avena en siembras tardías de otoño-invierno. El estudio está diseñado para evaluar la hipótesis de que existen genotipos de cereales de grano pequeño y cártamo con características adecuadas para incrementar la composición nutritiva del forraje y los rendimientos de materia seca y nutrientes por hectárea, respecto a la avena en siembras tardías de otoño-invierno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

Los experimentos se realizaron en los ciclos de producción de otoño-invierno 2017/2018 y 2018/2019, en el Campo Experimental La Laguna, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), localizado en Matamoros, Coahuila, México (25° 32' N, 103° 14' O y 1150 m sobre el nivel del mar). El suelo en el sitio experimental presenta una textura franco arcillosa, con una profundidad mayor a 1.8 m, valores de disponibilidad de agua de 150 mm m^{-1} (Santamaría *et al.*, 2008), contenido de carbono orgánico de 0.75% y un pH de 8.14 (Santamaría *et al.*, 2006).

Tratamientos evaluados

La investigación consistió en comparar el comportamiento de cinco especies forrajeras como: avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeon vulgare* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), triticale (*xTriticosecale* Wittmack) y cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Los cultivares fueron: Avena (Cuauhtémoc y Karma), cebada (Cántabra, Narro95 y Valencia), trigo (AN265 y Salamanca), triticale (AN105 y Rio Nazas) y cártamo (CD686, Selkino y Guayalejo).

Preparación del terreno

La preparación del terreno consistió en un paso de arado, seguido de doble rastreo y nivelación con escropa. La dosis de fertilización para N y P, se calculó considerando la capacidad de extracción del cultivo: 250 y 80 kg de N, P_2O_5 ha^{-1} respectivamente. La fuente de nitrógeno fue urea (46% de N) y la de fósforo, fosfato monoamónico (52% de P_2O_5). Para este último la dosis completa se aplicó a la siembra, la del N se distribuyó en porcentaje de 20, 40, 40 a la siembra, primero y segundo riegos de auxilio, respectivamente. La

preparación del terreno y fertilización fue la misma en ambos ciclos del cultivo. No se aplicó fertilizante potásico debido a que los suelos en la región presentan un alto contenido de potasio disponible, con valores promedio de 3030 kg ha^{-1} a 0.30 m de profundidad (Santamaría *et al.*, 2006).

Siembra y manejo agronómico del cultivo

En ambos experimentos la siembra se realizó en seco de forma manual, el 21 de diciembre de 2017 (Experimento 1) y el 23 de diciembre de 2018 (Experimento 2); el riego de siembra se aplicó el día siguiente. La densidad de siembra de los cereales fue de 80 kg ha^{-1} de semilla con 85% de germinación. Cada parcela experimental se estableció en 12 hileras con una distancia entre surcos de 18 cm y 6 m de longitud (12.96 m^2). La parcela útil fue de 5 m de longitud de los 10 surcos centrales (9 m^2). Cuando la planta del cultivo de cártamo alcanzó una altura de 15 cm se realizó un aclareo en toda la parcela experimental con la finalidad de dejar una densidad de 1,2 millones de plantas por hectárea. El cultivo del cártamo y los cereales recibieron un total de tres riegos de auxilio durante todo el ciclo; a los 34, 56 y 74 días después de la siembra (dds). Las etapas fenológicas de los cereales al aplicar los riegos luego de la siembra fueron: amacollamiento, encañe y embuche. La lamina en el riego de siembra fue de 150 mm en los otros tres riegos fueron de 130 mm.

Variables respuesta

El índice de área foliar (IAF) se midió semanalmente durante el desarrollo del cultivo usando un ceptómetro AccuPAR PAR/LAI modelo LP-80 (Decagon Devices, Inc., Pullman WA), se tomaron seis lecturas por parcela entre las 1200 y 1400 h tiempo solar. En la cosecha se determinaron los rendimientos de forraje fresco y de MS. El contenido de MS se determinó en una muestra de 0.4 m^2 tomada al azar en la parcela útil. Para ello, se muestrearon 0.74 m de tres de los surcos centrales de cada parcela. Las plantas muestreadas fueron pesadas en fresco, luego se realizó un pre-secado bajo la protección de un invernadero por cinco días, y posteriormente las muestras fueron secadas a 65 °C en una estufa de aire forzado por 48 a 72 horas hasta alcanzar peso constante (Novotny *et al.*, 2018; Buthelezi *et al.*, 2019). El rendimiento de MS se estimó multiplicando el rendimiento de forraje fresco por el porcentaje de MS del forraje en cada parcela útil. Las plantas muestreadas para estimar el contenido de MS fueron utilizadas para analizar el valor nutritivo del forraje. Las muestras de forraje en base seca se molieron en un molino Wiley® (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) con malla de 1 mm. En cada muestra se determinó el contenido de nitrógeno utilizando el método de combustión Dumas número 990.03 de AOAC mediante el equipo Thermo Scientific Flash 2000 y el resultado se multiplicó por 6.5 para obtener el porcentaje de proteína cruda (PC) de la muestra (AOAC, 2005). La fibra neutro detergente (FND) y la fibra ácido detergente (FAD) se analizaron de acuerdo a Georing y Van Soest (1970). La

digestibilidad “*in vitro*” de la MS (DIVMS) se obtuvo utilizando una muestra del forraje seco y molido en la incubadora (Ankom Technology) Daisy (Ankom Technology, 2017). El contenido de energía neta para lactancia (EN_L) se determinó mediante la metodología propuesta por Weiss *et al.* (1992). Los rendimientos de PC y EN_L por hectárea se obtuvieron al multiplicar los contenidos de PC y EN_L por el rendimiento de MS por hectárea estimado en cada parcela experimental. El rendimiento de MS digestible (MSD) por hectárea se obtuvo al multiplicar DIVMS por el rendimiento de MS por hectárea.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos para las variables en estudio se presentan por ciclo. Se realizaron análisis de varianza ($P < 0.05$) para las siguientes variables: rendimientos de MS, PC, EN_L , MSD y concentraciones de PC, FND, FAD y DIVMS. Para comparar las medias se utilizó la prueba de la diferencia mínima significativa protegida de Fisher ($P \leq 0.05$). El análisis de la información se efectuó con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clima y desarrollo del cultivo

Las temperaturas durante los dos ciclos de producción tuvieron un comportamiento diferente. La temperatura media del ciclo 2018-2019 fue más alta en diciembre y enero respecto a la ocurrida en 2017-2018, debido a las mayores temperaturas máximas y mínimas registradas en ese período (Figura 1). En enero ocurrió la emergencia de plántulas, posteriormente, en febrero y marzo durante la elongación del tallo y el crecimiento rápido de las plantas, la temperatura media del ciclo 2018-2019 fue menor, debido principalmente a una más baja temperatura mínima.

En relación a las temperaturas promedio de 30 años, las temperaturas medias de los dos ciclos del estudio fueron superiores, principalmente debido a que las temperaturas máximas fueron mayores durante todo el ciclo de crecimiento de los cereales y el cártamo. La precipitación ocurrida durante el desarrollo del cultivo fue mayor en el ciclo 2017-2018 (60,2 mm) respecto a la registrada en el ciclo 2018-2019 (21,30 mm) y en el promedio de 30 años (28,43 mm) (Figura 1).

El crecimiento y desarrollo de la cebada, el trigo y el triticale fue normal en los dos ciclos de crecimiento, mientras que la avena en 2017-2018 presentó problemas de enfermedades como roya (*Puccinia coronata*), cenicilla (*Erysiphe graminis*) y síntomas asociados al virus del enanismo amarillo de la cebada (bydv, por sus siglas en inglés) transmitido por pulgones. El virus del enanismo amarillo de la cebada (VEAC) es transmitido por áfidos *Sitobion avenae* (Fab), *Metopolophium dirhodum* (Wlk) y *Rhopalosiphum padi* L. (Herrera y Quiroz, 1983). En estudios realizados por (Navarro, 2017) menciona que la especie *Sitobion avenae* (Fab), puede llegar a producir entre 15 a 20 generaciones al año con una temperatura media de 20°C y una humedad relativa entre 75-80 %.

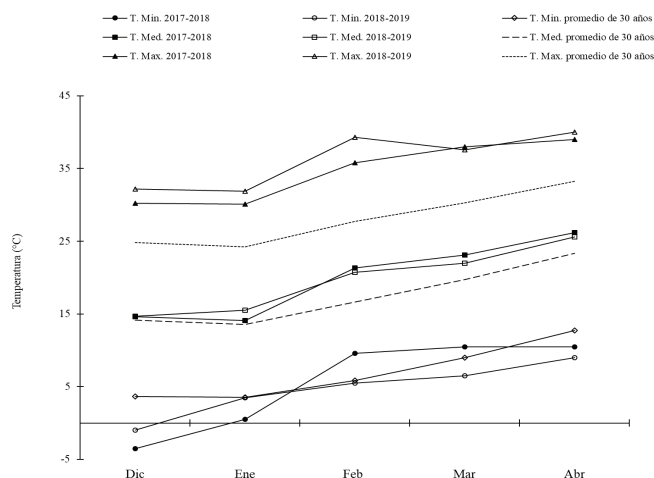


Figura 1. Temperatura (a) y precipitación (b) mensual durante el ciclo de desarrollo del cártamo en los dos años de estudio y los valores promedio de 30 años (1990-2019) en el Campo Experimental La Laguna, México.
Figure 1. Monthly temperature (a) and precipitation (b) during the safflower development cycle in the two years of study and the average values of 30 years (1990-2019) in the La Laguna Experimental Field, Mexico.

El crecimiento y desarrollo de la cebada, el trigo y el triticale fue normal en los dos ciclos de crecimiento, mientras que la avena en 2017-2018 presentó problemas de enfermedades como roya (*Puccinia coronata*), cenicilla (*Erysiphe graminis*) y síntomas asociados al virus del enanismo amarillo de la cebada (bydv, por sus siglas en inglés) transmitido por pulgones. El virus del enanismo amarillo de la cebada (VEAC) es transmitido por áfidos *Sitobion avenae* (Fab), *Metopolophium dirhodum* (Wlk) y *Rhopalosiphum padi* L. (Herrera y Quiroz, 1983). En estudios realizados por (Navarro, 2017) menciona que la especie *Sitobion avenae* (Fab), puede llegar a producir entre 15 a 20 generaciones al año con una temperatura media de 20°C y una humedad relativa entre 75-80 %.

La ocurrencia de enfermedades foliares en avena durante el ciclo 2017-2018 se asoció a una mayor precipitación respecto a 2018-2019, con días nublados y precipitación de 13 mm en febrero. Además, en 2017-2018 se presentaron temperaturas mínimas y medias más altas durante febrero e inicios de marzo (Figura 1), condiciones que propiciaron la aparición de áfidos cuando el cultivo estaba en la etapa de elongación del tallo. Estas enfermedades causaron una reducción del crecimiento de la planta y el secado de hojas durante la elongación del tallo e inicio de espigado de las avenas. Los resultados del ataque de las enfermedades foliares fueron una disminución de la altura de planta y el IAF de los dos cultivares de avena, respecto a los valores obtenidos en el ciclo 2018-2019 (Tabla 1), cuando no se observaron síntomas de enfermedades.

Tabla 1. Altura de planta e índice de área foliar (IAF) máximo de cultivares de cártamo y cereales de grano pequeño en dos ciclos de producción.

Table 1. Plant height and maximum leaf area index (LAI) of safflower and small grain cereal cultivars in two production cycles.

Especie/cultivar	2017-2018		2018-2019	
	Altura planta (cm)	IAF máximo	Altura planta (cm)	IAF máximo
Cártamo CD868	115.4	4.86	102.4	5.59
Cártamo Guayalejo	115.4	5.37	97.8	6.07
Cártamo Selkino	93.8	5.23	92.0	5.99
Avena Cuauhtémoc	75.0	4.71	97.7	5.45
Avena Karma	88.8	3.98	96.8	5.34
Triticale Río Nazas	112.5	3.56	115.3	7.12
Triticale AN105	93.3	4.55	105.0	7.64
Trigo Salamanca	89.2	3.76	82.2	6.50
Trigo AN265	91.7	4.01	100.2	7.95
Cebada Cantabria	92.5	4.14	105.8	6.75
Cebada Valencia	83.3	3.03	93.2	6.67
Cebada Narro 95	90.0	4.30	103.1	7.38

Composición nutritiva del forraje

En el ciclo 2017-2018, las enfermedades foliares no afectaron la composición nutricional de la avena, la cual fue similar ($P < 0.05$) a la observada en los otros cereales en cuanto a contenidos de PC, EN_L y la DIVMS. Los cultivares de triticale, trigo y las cebadas Cantabria y Narro 95 presentaron mayores contenidos ($P < 0.05$) de FDN y FDA que la avena, pero el contenido de EN_L y DIVMS solo fue menor ($P < 0.05$) en el triticale Río Nazas. También la composición nutricional de la avena fue igual ($P > 0.05$) o mayor ($P < 0.05$) a la de los cártamos, los cuales solamente fueron superiores a los cereales en el contenido de PC ($P < 0.05$). En los cultivares de cártamo se observó mayores contenidos ($P < 0.05$) de FDA, pero sólo en el cultivar CD868 fue menor ($P < 0.05$) la concentración de EN_L y la DIVMS (Tabla 2).

Tabla 2. Composición nutricional de cultivares de cártamo y cereales de grano pequeño en el ciclo de producción 2017-2018.

Table 2. Nutritional composition of safflower cultivars and small grain cereals in the 2017-2018 production cycle.

Especie/cultivar	[†] PC (g kg ⁻¹)	FDN (g kg ⁻¹)	FDA (g kg ⁻¹)	DIVMS (g kg ⁻¹)	EN _L (MJ kg ⁻¹ MS)
Cártamo CD868	220.2 b [‡]	507.6 d	427.2 ab	535.8 de	4.37 de
Cártamo Guayalejo	231.0 ab	509.1 d	433.4 ab	554.2 cde	4.54 cde
Cártamo Selkino	243.5 a	504.6 d	440.4 a	559.8 bcd	4.60 cde
Avena Cuauhtémoc	167.0 cde	542.0 d	340.0 e	606.0 abc	5.12 abc
Avena Karma	158.5 de	609.4 bc	381.6 d	576.1 abcd	4.92 abcd
Triticale Río Nazas	156.8 e	615.1 bc	400.5 bcd	520.8 de	4.27 e
Triticale AN105	178.5 cd	640.5 ab	421.4 abc	556.9 cd	4.75 bcde
Trigo Salamanca	152.5 e	601.4 bc	390.1 cd	582.8 abcd	4.97 abcd
Trigo AN265	154.0 e	657.9 a	449.5 a	493.4 e	4.13 e
Cebada Cantabria	168.0 cde	589.4 c	380.3 d	634.2 a	5.49 a
Cebada Valencia	171.0 cde	531.6 d	337.8 e	619.8 ab	5.27 ab
Cebada Narro 95	182.2 c	582.6 c	381.0 d	634.0 a	5.47 a

[†]PC = proteína cruda; FDN = fibra detergente neutro; FDA = fibra detergente ácido; DIVMS = digestibilidad de la materia seca; EN_L = energía neta para lactancia.

[‡] Medias en cada columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes (DMS $P \leq 0.05$).

En el ciclo 2018-2019 los resultados fueron similares a los observados en 2017-2018 en cuanto que la avena obtuvo contenidos de PC, EN_L y DIVMS similares ($P < 0.05$) a los otros cereales. Respecto a la respuesta del cártamo, también los tres cultivares alcanzaron mayores concentraciones ($P < 0.05$) de PC que los cereales, sin embargo, también presentaron menor contenido ($P < 0.05$) de EN_L que la avena. El cultivar sin espinas CD868 también obtuvo menor valor ($P < 0.05$) de DIVMS (Tabla 3).

Tabla 3. Composición nutricional de cultivares de cártamo y cereales de grano pequeño en el ciclo de producción 2018-2019.

Table 3. Nutritional composition of safflower cultivars and small grain cereals in the 2018-2019 production cycle.

Especie/cultivar	[†] PC (g kg ⁻¹)	FDN (g kg ⁻¹)	FDA (g kg ⁻¹)	DIVMS (g kg ⁻¹)	EN _L (MJ kg ⁻¹ MS)
Cártamo CD868	177.9 abc [‡]	500.6 f	425.1 a	557.9 c	4.58 c
Cártamo Guayalejo	189.6 ab	494.6 f	401.4 ab	585.8 abc	4.87 bc
Cártamo Selkino	197.8 a	500.2 f	398.2 ab	581.0 bc	4.81 bc
Avena Cuauhtémoc	145.0 de	620.3 abc	437.9 a	665.7 ab	5.85 a
Avena Karma	147.3 cde	632.0 ab	391.6 ab	669.0 ab	5.88 a
Triticale Río Nazas	149.8 cde	617.6 abcd	373.7 abc	645.4 abc	5.63 ab
Triticale AN105	164.3 bcd	650.5 a	401.4 ab	658.5 ab	5.80 a
Trigo Salamanca	152.5 cde	566.0 e	332.6 bc	670.2 ab	5.82 a
Trigo AN265	138.2 def	598.1 bcde	369.8 abc	620.3 abc	5.34 abc
Cebada Cantabria	128.6 ef	604.5 abcde	354.0 bc	646.2 abc	5.62 ab
Cebada Valencia	111.5 f	571.8 de	320.6 c	674.6 a	5.86 a
Cebada Narro 95	146.4 cde	577.9 cde	346.8 bc	617.1 abc	5.28 abc

[†]PC = proteína cruda; FDN = fibra detergente neutro; FDA = fibra detergente ácido; DIVMS = digestibilidad de la materia seca; EN_L = energía neta para lactancia.

[‡] Medias en cada columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes (DMS $P \leq 0.05$).

Los resultados del estudio en los dos ciclos de producción indican que ninguna de las especies evaluadas como alternativa a la avena, presentaron ventajas en su composición nutricional, con excepción del cártamo que obtuvo más altas concentraciones de PC. Sin embargo, el cártamo mostró valores menores de EN_L y MS digestible, especialmente el cultivar CD868. La mayor concentración de PC en cártamo respecto a la avena también fue observada por Reta *et al.* (2017) en tres edades de cosecha. Pero en concentración de fibras y energía, estos autores no coinciden con los resultados del presente estudio, ya que ellos observaron en cártamo contenidos de FDN (394 a 445 g kg⁻¹), FDA (314 a 385 g kg⁻¹) y de ENL (5.15 a 5.82 g kg⁻¹) similares o mejores a los de la avena (FDN = 547 a 552 g kg⁻¹; FDA = 349 a 391 g kg⁻¹; ENL = 4.98 a 5.40 MJ kg⁻¹ MS).

En cereales, las especies triticale, trigo y cebada presentaron una composición nutricional similar a la observada en avena Cuauhtémoc, con una tendencia a un mayor de contenido fibroso en triticale y trigo. Este mismo comportamiento entre cereales fue observado por Reta *et al.* (2018) al comparar la composición nutricional de avena, triticale, trigo y cebada en siembras tardías de otoño-invierno en la Comarca Lagunera. Los contenidos de FDN en el presente estudio, fueron similares a los obtenidos por Núñez *et al.* (2007) en la

etapa de embuche (552 a 618 g kg⁻¹) y a los observados para cereales cosechados en inicio de floración (587 a 614 g kg⁻¹) (Núñez y Faz, 2005).

Rendimiento de nutrientes

En el ciclo de crecimiento 2017-2018, los cultivares de triticale, trigo, cebada y el cártamo CD868 presentaron mayores rendimientos de MS (20.6 a 40.4 %) que la avena Cuauhtémoc ($P < 0.05$); la cual presentó problemas con enfermedades foliares (Tabla 4). En el segundo ciclo con un desarrollo normal de la avena, sólo las cebadas Valencia y Narro 95; y los trigos fueron superiores ($P < 0.05$) en rendimientos de MS (23.8 a 39.0 %) (Tabla 5).

Tabla 4. Rendimiento de nutrientes de cultivares de cártamo y cereales de grano pequeño en el ciclo de producción 2017-2018.

Table 4. Nutrient yield of safflower and small grain cereal cultivars in the 2017-2018 production cycle.

Especie/cultivar	MS (kg ha ⁻¹)	PC (kg ha ⁻¹)	EN _L (MJ ha ⁻¹)	MSD (kg ha ⁻¹)
Cártamo CD868	8277 ab [†]	1828 a	36293 abcde	4448 abcd
Cártamo Guayalejo	6981 cdef	1610 ab	31742 e	3865 cd
Cártamo Selkino	6467 ef	1566 abc	29980 e	3635 d
Avena Cuauhtémoc	6081 f	1017 f	31415 e	3708 d
Avena Karma	6876 def	1086 ef	33948 cde	3984 cd
Triticale Río Nazas	7798 abcd	1228 def	33234 de	4062 bcd
Triticale AN105	7334 bcde	1306 cde	35122 cde	4112 bcd
Trigo Salamanca	8104 abc	1237 def	40183 abcd	4717 abc
Trigo AN265	8539 a	1316 cde	35235 bcde	4218 abcd
Cebada Cántabra	7958 abcd	1332 cde	43511 ab	5040 a
Cebada Valencia	7900 abcd	1368 bcd	41587 abc	4902 ab
Cebada Narro 95	8032 abcd	1458 bcd	43848 a	5087 a

[†]MS = Materia Seca; PC = proteína cruda; EN_L = energía neta para lactancia; MSD = Materia seca digestible.

*Medias en cada columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes (DMS $P \leq 0.05$)

Tabla 5. Rendimiento de nutrientes de cultivares de cártamo y cereales de grano pequeño en el ciclo de producción 2018-2019.

Table 5. Nutrient yield of safflower and small grain cereal cultivars in the 2018-2019 production cycle.

Especie/cultivar	MS (kg ha ⁻¹)	PC (kg ha ⁻¹)	EN _L (MJ ha ⁻¹)	MSD (kg ha ⁻¹)
Cártamo CD868	7347 de [†]	1308 abc	33924 cde	4120 def
Cártamo Guayalejo	6536 ef	1252 abc	31765 de	3826 ef
Cártamo Selkino	5675 f	1127 abc	27472 e	3308 f
Avena Cuauhtémoc	7433 de	1068 bc	43338 bcd	4942 cde
Avena Karma	8339 bcd	1232 abc	49099 ab	5582 abc
Triticale Río Nazas	8517 bcd	1292 abc	48045 ab	5509 abcd
Triticale AN105	8083 cd	1335 abc	46970 abc	5332 abcd
Trigo Salamanca	9385 abc	1440 a	54501 ab	6282 abc
Trigo AN265	10336 a	1427 ab	55078 ab	6396 ab
Cebada Cántabra	7645 de	986 c	43016 bcd	4947 bcde
Cebada Valencia	9697 ab	1081 abc	58149 a	6664 a
Cebada Narro 95	9202 abc	1329 abc	48790 ab	5694 abc

[†]MS = Materia Seca; PC = proteína cruda; EN_L = energía neta para lactancia; MSD = Materia seca digestible.

*Medias en cada columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes (DMS $P \leq 0.05$).

Debido a que la composición nutritiva entre cereales no fluctuó fuertemente, en el ciclo 2017-2018 los mayores rendimientos de MS ($P < 0.05$) en cebada y trigo respecto a la avena Cuauhtémoc, resultaron también en mayores rendimientos ($P < 0.05$) de EN_L (27.9 a 39.6 %) y MS digestible (27.2 a 37.2 %) en las cebadas y el trigo Salamanca, además de rendimientos más grandes de PC ($P < 0.05$) en las cebadas (31.0 a 43.4 %), triticale AN105 (28.4 %) y el trigo AN265 (29.4 %). De los cártamos sólo el cultivar sin espinas CD868 superó en rendimiento de MS (36.1%) a la avena Cuauhtémoc, mientras que los tres cultivares fueron superiores en el rendimiento de PC (54.0 a 79.7 %). Todos los cártamos produjeron rendimientos de EN_L y MS digestible similares a los observados en avena Cuauhtémoc (Tabla 4).

En el ciclo 2018-2019 también hubo especies alternativas que superaron a la avena Cuauhtémoc, pero debido a que este cultivo fue más competitivo, las opciones fueron menores. En rendimiento de MS, los trigos y las cebadas obtuvieron rendimientos mayores a los de la avena Cuauhtémoc. En producción de nutrientes, el trigo Salamanca produjo más rendimientos de PC, la cebada Valencia superó a la avena tanto en producción de EN_L como de MS digestible, mientras que el trigo AN265 obtuvo mayor producción de MS digestible. El cártamo por su parte, produjo rendimientos de MS y nutrientes similares a los obtenidos por avena Cuauhtémoc (Tabla 5).

En los cereales alternativos a la avena, los mayores rendimientos de MS obtenidos en el presente estudio (8083 a 10336 kg ha⁻¹), fueron similares a los observados por Reta *et al.* (2018) en otro estudio donde se evaluaron cultivares de avena, cebada, trigo y triticale en siembras tardías de otoño-invierno (9104 a 10986 kg ha⁻¹). En este trabajo la cebada, el trigo y el triticale produjeron mayores rendimientos de MS, PC y EN_L por hectárea que la avena.

En otros trabajos realizados en la Comarca Lagunera con cultivares de cártamo tradicionales (con espinas) cosechados en las etapas 50 y 55 (Flemmer *et al.*, 2015), los rendimientos fluctuaron de 6016 a 7760 kg ha⁻¹ de MS, 1044 a 1380 kg ha⁻¹ de PC y de 32677 a 44526 MJ ha⁻¹ en EN_L (Reta *et al.*, 2014; Reta *et al.*, 2015; Reta *et al.*, 2017). En el presente estudio, el nivel de rendimiento de MS del cártamo cosechado en la etapa 59 fue similar o ligeramente mayor (6467 a 8277 kg ha⁻¹) a los observados en los trabajos previos; sin embargo, fue menor al encontrado por Reta *et al.* (2017) en siembras tardías con cultivares tradicionales y sin espinas cosechados en la etapa 59. En este trabajo se obtuvieron rendimientos 8360 a 10531 kg ha⁻¹ de MS, de 1313 a 1532 kg ha⁻¹ de PC y de 47918 a 59480 MJ ha⁻¹ en EN_L. Los valores de rendimiento de PC fueron menores a los observados en el presente estudio, debido a un menor contenido de PC (151.3 a 200.5 g kg⁻¹) en el forraje, mientras que los rendimientos de EN_L fueron mayores debido a los rendimientos de MS más altos en el trabajo previo.

Considerando la respuesta de las especies en los dos ciclos de crecimiento, las especies alternativas con mayor consistencia en su comportamiento fueron la cebada y el

trigo, con mejores rendimientos de MS y nutrientes, especialmente en la producción de EN_L y MS digestible en cebada, y de rendimientos de PC y MS digestible en trigos. Los cártamos, especialmente el cultivar CD868, fueron superiores en potencial forrajero a la avena sólo en el ciclo en que esta especie presentó problemas con enfermedades foliares. Cuando la avena presentó un desarrollo normal, los cártamos presentaron rendimientos de MS y nutrientes similares a los de la avena.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que se puede incrementar el potencial forrajero en siembras tardías de otoño-invierno utilizando cebada y trigo, independientemente de que existan o no condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades foliares en avena. En ciclos de crecimiento con enfermedades foliares en avena, las especies triticales, trigo, cebada y cártamo son alternativas para incrementar el potencial forrajero.

REFERENCIAS

- Ankom Technology. 2017. Procedures for in Vitro True Digestibility Method (DVIVMS-Daisy). Disponible en: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_3_Invitro_D200_D200l.pdf
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS). 2005. Official Methods of Analysis. Dumas method (990.03). 15th edition. Washington D.C., USA.
- Bar-Tal, A., Landau, S., Li-xin, Z., Markovitz, T., Keinan, M., Dvash, L., Brener, S. y Weinberg, Z.G. 2008. Fodder quality of safflower across an irrigation gradient and with varied nitrogen rates. *Agronomy Journal*. 100: 1499-1505. <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0353>
- Buthelezi, L.S., Mupangwa, J.F., Muchenje, V. y Nherera Ch. 2019. Influence of drying technique on chemical composition and ruminal degradability of subtropical *Cajanus cajan* L. *Animal Nutrition*. 5: 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.001>
- Flemmer, A.C., Franchini, M.C. y Lindström, L.I. 2015. Description of safflower (*Carthamus tinctorius* L) phenological growth stages according to the extended BBCH scale. *Annals of Applied Biology*. 166: 331-339. <https://doi.org/10.1111/aab.12186>
- Geoering, H.K. y Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis. Apparatus, reagents, procedure and some applications. *Agric. Handbook* 379. ARS. USDA. Washington DC. 20 pp.
- Herrera, M.G., y Quiroz E.C. 1983. Distribución y factores epidemiológicos del virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 43 (2): 121-126.
- Leshem, Y., Brukental, I., Landau, S., Ashbell, G., Weinberg, Z.G. y Brosh, A. 2000. Salower - new forage crop in Israel. *Meshek Habakar Vehachalar*. 286: 27-32.
- Maas, E.V., Poss, J.A. y Hoffman, G.J. 1986. Salt tolerance of plants. *Applied Agriculture Research*. 1: 12-26.
- Navarro, P. 2017. Entomología-Plagas en cultivos: Pulgón amarillo de los cereales. Ficha Técnica 64. INIA-Programa Sanidad Vegetal.
- Novotny, L., King, J., Phillips, K. y Thieh, N. 2018. Recommendations and critical factors in determining moisture in animal feeds. AAFCO's Laboratory Methods and Services Committee. Moisture Best Practices Working Group. Disponible en: https://www.aafco.org/Portals/0/SiteContent/Laboratory/Loss_on_drying-moisture/Recommendations_and_Critical_Factors_for_Determining_Moisture_in_Animal_Feed.pdf. Consultado en: 13 marzo 2021.
- Núñez, H.G. y Faz, C.R. 2005. Producción y calidad nutricional de cereales de grano pequeño capuchones (sin aristas) en la Región Lagunera en invierno. pp. 290-294. Memoria de la XVII Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED.
- Núñez, H.G., Faz, C.R. y Martínez, R.J.G. 2007. Sistemas de producción de triple cosecha anual de forraje para la Región Lagunera. *Agrofaz*. 7: 1-12.
- Reta, S.D.G., Sánchez, D.J.I., Reyes, G.A., Ochoa, M.E., Chew, M.Y.I. y Gaytán, M.A. 2017a. Evaluación semicomercial de cártamo forrajero en siembras tardías durante otoño-invierno en la Comarca Lagunera, México. *Agrofaz*. 17: 51-63.
- Reta, S.D.G., Sánchez, D.J.I., Torres, H.D., Reyes, G.A., Ochoa, M.E., Chew, M.Y.I. y Cueto W.J.A. 2018. Evaluación semicomercial de cereales alternativos en siembras tardías de otoño-invierno en la Comarca Lagunera. *Agrofaz*. Vol. Especial Celala: 69-79.
- Reta, S.D.G., Serrato, C.J.S., Gaytán, M.A., Quiroga, G.H.M., Orozco, H.G. y Payán, G.J.A. 2014. Potencial forrajero del cártamo en respuesta al distanciamiento entre surcos en la Comarca Lagunera. *Agrofaz*. 14: 65-71.
- Reta, S.D.G., Serrato, C.J.S., Gaytán, M.A., Quiroga, G.H.M., Orozco, H.G. y Payán, G.J.A. 2015. Potencial forrajero de variedades comerciales y genotipos élite de cártamo en la Comarca Lagunera. *Agrofaz*. 15: 27-38.
- Reta, S.D.G., Serrato, C.J.S., Quiroga, G.H.M., Gaytán, M.A. y Figueroa, V.U. 2017b. Secuencias de cultivo alternativas para incrementar el potencial forrajero y productividad del agua. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 8: 397-406. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i4.4645>
- Sánchez, M.H., Reta, S.D.G., Serrato, C.J.S., Figueroa, V.U., Cueto, W.J.A. y Castellanos, P.E. 2018. Efecto de la fecha de siembra sobre el potencial forrajero de cultivares primaverales de canola en la Comarca Lagunera, México. *ITEA*. 114: 223-242. <https://doi.org/10.12706/itea.2018.014>
- Sanderson, M.G., Hemming, D.L. y Betts, R.A. 2011. Regional temperature and precipitation changes under high-end (≤ 4 °C) global warming. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 369: 85-98. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0283>
- Santamaría, J.C., Reta, S.D.G., Chávez, G.J.F., Cueto, W.J.A. y Romero, P.J.I. 2006. Caracterización del medio físico en relación a cultivos forrajeros alternativos para la Comarca Lagunera. Libro Técnico No. 2. ISBN 970-43-0048-4. INIFAP-CIRNOC-CELALA. 240 pp. Disponible en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/1944>. Consultado: 26 febrero 2021.
- Santamaría, C.J., Reta, S.D.G. y Orona, C.I. 2008. Reducción del rendimiento potencial de maíz forrajero en calendario con tres y cuatro riegos. *Terra Latinoamericana* 26: 235-241.
- SAS Institute. 2011. The SAS system for windows, release 9.3. Statistical Analysis Systems Inst., Cary, NC.
- SIAP (Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera). 2021. Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y

Alimentación. Ciudad de México. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp. Consultado: 25 Marzo 2021.

Snyder, R.L. y Melo-Abreu, J.P. 2005. Frost protection: fundamentals, practice and economics. Volume 1. FAO Environment and Nature Resources Service Series. No. 10.

Weiss, W.P., Conrad, H.R. y St-Pierre, N.R. 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Animal Feed Science and Technology*. 39: 95-110. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(92\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(92)90034-4).

Efecto de rizobacterias solubilizadoras de calcio en caracteres agronómicos y minerales de *Tagetes erecta*

Effect calcium solubilizing rhizobacteria on agronomic characters and mineral of *Tagetes erecta*

Ramos Salazar RA, Mendoza Villarreal R*, Robledo Torres V, Hernández Pérez A

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

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar tres rizobacterias silvestres (*Bacillus* sp., *B. cereus* y *B. licheniformis*) inoculadas de forma individual y combinadas sobre las propiedades agronómicas y calidad mineral de flor de cempasúchil en campo abierto. Se evaluaron ocho tratamientos: T0=testigo, T1= *Bacillus* sp., T2= *B. cereus*, T3= *B. licheniformis*, T4= *Bacillus* sp. + *B. cereus*, T5= *Bacillus* sp. + *B. licheniformis*, T6= *B. cereus* + *B. licheniformis*, T7= *Bacillus* sp. + *B. cereus* + *B. licheniformis*, se aplicó solución nutritiva Steiner sin Calcio. El experimento se estableció en bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los resultados mostraron que la biomasa fresca y seca de raíz se incrementó con la aplicación del tratamiento T6, la biomasa fresca, biomasa seca de follaje y contenido de carotenoides totales (847.01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presentaron mayores valores en T5, En minerales, el calcio se concentró en hoja en T2 y T1, el magnesio en hoja en T7, en tallo el potasio en T5, el fósforo en pétalos en T5, en hojas el nitrógeno en T1 y T2. La aplicación de *Bacillus* es una alternativa para sustituir los fertilizantes cálcicos, lo que podría ayudar a mitigar los efectos negativos de una fertilización química.

Palabras clave: Calcio; PGPR; *Tagetes erecta*; *Bacillus*.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate three wild rhizobacteria (*Bacillus* sp, *B. cereus* and *B. licheniformis*), inoculated individually and in combination on the agronomic properties and mineral quality of marigold crop on open field. Eight treatments were compared: T0= control, T1= *Bacillus* sp., T2= *B. cereus*, T3= *B. licheniformis*, T4= *Bacillus* sp. + *B. cereus*, T5= *Bacillus* sp. + *B. licheniformis*, T6= *B. cereus* + *B. licheniformis*, T7= *Bacillus* sp. + *B. cereus* + *B. licheniformis*, with Steiner nutrient solution without Calcium. The experiment was established in randomized complete blocks with three repetitions per treatment. The results showed that the fresh and dry root biomass increased with the application of the T6 treatment, fresh biomass, dry foliage biomass and total carotenoids (847.01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presented higher values in T5. Meanwhile the minerals, calcium was concentrated in leaves, in T2 and T1, magnesium in leaves in T7, potassium in stem in T5, phosphorus in petals in T5, nitrogen in leaves in T1 and T2. *Bacillus* application is an alternative to replace calcium

fertilizers, which could help mitigate the negative effects of chemical fertilization.

Keywords: Calcium; PGPR; *Tagetes erecta*; *Bacillus*.

INTRODUCCIÓN

La fertilización química es una actividad necesaria en la agricultura moderna, ya que proporciona a los cultivos los nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo de las plantas a corto plazo, pero con aplicación constante podría ocasionar el deterioro de las propiedades físicas y químicas de los suelos, como la acidificación de los mismos, la compactación del suelo (Yan *et al.*, 2018) y pérdida de N y P por escurrimiento (Raubert, *et al.*, 2018).

La flor de cempasúchil es una flor ornamental de corte de gran importancia cultural en México, es parte fundamental del día de muertos, también es conocida como flor de muerto. Es una fuente alimenticia de gran relevancia por las propiedades antioxidantes y el potencial neuroprotector que posee (Moliner *et al.*, 2018). Además, gracias a los carotenoides, los principales pigmentos de la flor, pueden ser utilizados como colorantes para alimentos funcionales (Petrova *et al.*, 2016).

Uno de los métodos para reducir el uso de estos fertilizantes es con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), presentes en la rizósfera de la planta y aportan efectos positivos para el desarrollo vegetal (Labra-Cardón, *et al.*, 2012), ácidos orgánicos, y enzimas, que solubilizan los minerales presentes en el suelo para que la planta pueda aprovecharlos (Chauhan *et al.*, 2017).

El género *Bacillus* es uno de los PGPR más utilizados por sus amplios mecanismos para el crecimiento vegetal. *B. pumilus* y *B. megaterium* tienen la capacidad de solubilizar los fosfatos y fijar el N de los suelos por lo que incrementa el transporte de estos nutrientes hacia las raíces (Kuan *et al.*, 2016). *B. subtilis* y *B. methylotrophicus* ayudan el crecimiento vegetal al producir fitohormonas como ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y espermidinas (Radhakrishnan y Lee, 2016). *B. subtilis* y *B. mojavensis* inhiben la senescencia al secretar ACC-deaminasa (Pourbabaee *et al.*, 2016.). *B. megaterium* y *B. methylotropicus* favorece la producción vegetal de proteínas, aminoácidos, azúcares, pigmentos fo-

*Autor para correspondencia: Rosalinda Mendoza Villarreal
Correo electrónico: rosalingdamendoza@hotmail.com

Recibido: 28 de noviembre de 2021

Aceptado: 16 de marzo de 2022

tosintéticos, así como la acumulación de minerales como K^+ , Na^+ , PO_4^{3-} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y NO_3^- (Radhakrishnan y Lee, 2016).

En este estudio se plantea el uso de rizobacterias solubilizadoras de Ca para reducir el uso de fertilizantes cálcicos convencionales y así aminorar la contaminación edafológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y selección de cepas bacterianas

Se utilizó suelo recolectado de la rizósfera de tomatillo silvestre en el estado de Coahuila, México para el aislamiento de las bacterias. Se pesó un gramo de muestra de suelo, se llevó a dilución seriada y se incubaron en cajas Petri con medio Rennie a 30 °C por 48 horas (Matsumoto *et al.*, 2005). Las colonias obtenidas se incubaron en medio Pikovskaya sólido a 30 °C por 48 horas. Se realizó una selección de aquellas colonias que presentaron halos de solubilización, las cuales fueron incubadas en medio Pikovskaya líquido por 48 horas a 30 °C a 120 rpm, filtrándose con papel filtro Whatman No. 42 para después diluirse 1 en 100 (Kumar *et al.*, 2012). La dilución fue medida en un Espectrómetro de Absorción Atómica GBC Xplor AA para determinar el calcio soluble presente (Sadzawka *et al.*, 2004). De todas las cepas, se seleccionaron las mejores tres con capacidad solubilizadora de calcio para ser probadas en campo. Se realizaron extracciones de ADN genómico de las tres cepas seleccionadas siguiendo la metodología proporcionada por Promega, proveedor del kit de extracción. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando la mezcla comercial GoTaq Green Master Mix, 2XTM (Promega, USA), con los primers PF27 y PR1429, según las especificaciones del fabricante. Los productos de PCR se enviaron al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad LANGE BIO, CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato para su identificación molecular.

Material vegetal y tratamientos

El experimento se llevó a cabo bajo condiciones de campo abierto en las instalaciones del departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, con ubicación geográfica de 25°21'22.52" de latitud norte y 101°2'9.88" longitud oeste, con una elevación de 1760 msnm con una precipitación media de 400 mm y una temperatura media anual entre 12 y 18 °C. Se utilizaron semillas de cempasúchil de crecimiento indeterminado proporcionadas por productores de la población de Atlixco, Puebla, México. Ocho tratamientos fueron evaluados: T0= testigo, T1= *Bacillus* sp., T2= *B. cereus*, T3= *B. licheniformis*, T4= *Bacillus* sp. + *B. cereus*, T5= *Bacillus* sp. + *B. licheniformis*, T6= *B. cereus* + *B. licheniformis*, T7= *Bacillus* sp. + *B. cereus* + *B. licheniformis*, se aplicó una solución nutritiva Steiner sin Calcio. Las semillas de cempasúchil se sembraron en charolas de poliestireno con 200 cavidades, se colocó una semilla en cada cavidad, se utilizó como sustrato una mezcla de peat moss con perlita a una proporción 1:1. El trasplante se realizó un mes después cuando las plátulas alcanzaron una altura de 30 cm a doble hilera con 15 cm de separación en camas de 0.80 x 7 m, con 0.80 m de distancia entre camas.

Al momento del trasplante se aplicaron 20 ml de los tratamientos a la base de las plantas a una concentración de 10^7 UFC mL⁻¹, en un diseño de bloques completos al azar, con 3 repeticiones y 10 plantas por repetición. Se utilizó la solución nutritiva Steiner sin la adición de calcio. Se hicieron otras dos aplicaciones a los 30 y 60 días después del trasplante. Cuando inició la floración, los órganos de las plantas fueron seccionados en raíz, tallo, hoja y pétalos, posteriormente, se midió la biomasa. La determinación de carotenoides se obtuvo por el método descrito por AOAC (1984).

Determinación de minerales

La determinación del calcio, magnesio y potasio se llevó a cabo mediante el método de espectrofotometría de absorción atómica en un EAA GBC xplor AA. La determinación de fósforo por el método de colorimetría en un espectrofotómetro UV-VIS Biomate V7-07. La determinación de nitrógeno mediante el método Micro-Kjeldhal, todos los anteriores siguiendo la metodología descrita por Sadzawka *et al.* (2004).

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el software InfoStat versión 2018.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solubilización de Ca *in vitro*

De las 11 cepas probadas, las cepas C06, identificada como *B. Cereus*, C09 identificada como *B. licheniformis* y C04 identificada como *Bacillus* sp. fueron las que presentaron la mayor solubilización de Ca (Tabla 1). La cepa de *B. cereus* solubilizó el 24.5% del Ca disponible en el medio, la cepa de *B. licheniformis*, solubilizó el 23.4% del Ca del medio, y en tanto la cepa de *Bacillus* sp. presentó un 23.0% de Ca soluble. El género *Bacillus* tiene la capacidad de producir moléculas de ácido indol-3-acético (Glick, 2014), que son capaces de solubilizar moléculas como el $Ca_3(PO_4)_2$ (Chauhan *et al.*, 2017), liberando los iones de $(PO_4)^{3-}$ a la rizósfera, siendo así asimilables para las plantas.

Propiedades agronómicas y carotenoides totales en flor

El rendimiento floral obtenido por los diferentes tratamientos estudiados se muestra en la Tabla 2, donde las combinaciones de *B. cereus* y *B. licheniformis* y entre *Bacillus* sp. y *B. cereus*, son estadísticamente iguales que el testigo. En experimentos similares, el género *Bacillus* no muestra incremento en los rendimientos, como sucede con *Pseudomonas fluorescens* (Amereshwar-Reddy & Saravanan, 2020) y *Azotobacter* (Rolaniya *et al.*, 2017).

En cuanto a la biomasa de la raíz, la interacción entre las cepas *B. cereus* y *B. licheniformis* fue la que estadísticamente presentó mayor biomasa fresca en comparación del testigo, siendo un 62.9% mayor, así mismo, ésta combinación incrementó la biomasa seca de raíz en 86.1%. En cuanto a la biomasa de la parte foliar, la combinación de *Bacillus* sp. y *B. licheniformis* presentó una biomasa fresca de 27.8% superior

al testigo. La producción de biomasa se ve favorecido al aplicarse cepas del género *Bacillus* en distintos cultivos como lo comprobaron Castro-Barquero *et al.* (2015) y Sosa-Pech *et al.* (2019) en distintos cultivos.

Tabla 1. Prueba de comparación de medias de solubilización de Ca en 11 cepas silvestres del estado de Coahuila

Table 1. Ca solubilization in 11 wild strains of the state of Coahuila mean comparison test.

Cepa	Calcio (mg L ⁻¹)	% solubilización Ca
C00	243.94 e	12.2 e
C01	408.28 cd	20.4 cd
C02	455.78 b	22.8 b
C03	412.66 cd	20.6 cd
C04	460.07 ab	23.0 ab
C05	408.31 cd	20.4 cd
C06	489.91 a	24.5 a
C07	386.51 d	19.3 d
C08	451.48 b	22.6 b
C09	468.62 ab	23.4 ab
C10	438.58 bc	21.9 bc
C11	393.05 d	19.7 d
CV(%)	2.57	2.57

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$; Tukey test).

Se puede observar que el tratamiento compuesto por la combinación de las cepas *Bacillus* sp. y *B. licheniformis* fue el que presentó un mejor comportamiento en comparación de los demás, obteniendo un 18.5% más carotenoides totales que el testigo. El calcio exógeno al ser añadido en cultivos como el tomate (Wasti *et al.*, 2016) y al tabaco (Hu *et al.*, 2018) ha producido plantas con mayor contenido de carotenoides totales en condiciones de estrés hídrico, al contrario la aplicación del género *Bacillus* no resulta tan efectiva para la producción de carotenoides (Karamat & Ahmed, 2018).

Contenido mineral

El contenido mineral en cada órgano de la planta se presenta en la Tabla 3. En el Ca²⁺ presente en la raíz, la interacción entre *Bacillus* sp. y *B. licheniformis* así como la cepa *Bacillus* sp. fueron los tratamientos con mayor contenido siendo superiores al testigo 102.2% y 62.0%. En el tallo se aprecia que la interacción entre *B. cereus* y *B. licheniformis* y la cepa individual *B. cereus* fueron los tratamientos que presentaron la más alta concentración de Ca²⁺, al ser superiores un 42.1% y 41.4% al testigo. En las hojas, la concentración de Ca²⁺ se observa que todos los tratamientos son estadísticamente superiores al testigo, destacando las cepas *B. cereus* y *Bacillus* sp. al superar al testigo por un 70.8% y 68.2%. La concentración de Ca²⁺ en los pétalos tuvo un comportamiento estadísticamente más uniforme, aun así, el tratamiento de la interacción entre las 3 cepas presentó un incremento de 30.4% en contraste con el testigo. Las concentraciones encontradas en el presente estudio son superiores a los encontrados por Sonmez *et al.* (2017).

Tabla 2. Rendimiento, biomasa fresca y seca y carotenoides totales de las plantas de cempasúchil tratadas con distintas cepas de rizobacterias solubilizadoras de Ca.

Table 2. Yield, fresh and dry biomass and total carotenoids of marigold plants treated with different strains of Ca-solubilizing rhizobacteria.

Tratamientos	Flores por m ²	Biomasa fresca de raíz (g)	Biomasa seca de raíz (g)	Biomasa fresca follaje (g)	Biomasa seca follaje (g)	Carotenoides totales en flor (ug/g)
T0	129.61 ab	31.76 cd	12.22 c	248.33 b	67.55 a	714.68 b
T1	121.28 bc	29.92 d	13.26 c	185.67 d	48.12 d	746.21 b
T2	102.78 de	42.94 b	15.96 b	241.67 b	67.51 a	742.84 b
T3	100.92 e	39.20 bc	13.59 c	187.33 d	49.94 d	699.09 b
T4	135.19 a	21.46 e	7.54 d	254.00 b	59.77 b	688.94 b
T5	100.03 e	27.29 de	9.41 d	317.33 a	66.18 a	847.01 a
T6	137.97 a	51.74 a	22.74 a	220.33 d	50.28 cd	735.07 b
T7	112.06 cd	38.47 bc	16.91 b	246.67 b	53.38 c	741.51 b
CV (%)	3.22	7.38	5.70	2.67	1.88	4.46

Donde T0 es el testigo; T1 es *Bacillus* sp.1; T2 es *Bacillus cereus*; T3 es *Bacillus licheniformis*; T4 es la interacción entre *Bacillus* sp.1 y *Bacillus cereus*; T5 es la interacción entre *Bacillus* sp.1 y *Bacillus licheniformis*; T6 es la interacción entre *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*; y T7 es la interacción entre *Bacillus* sp.1, *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$; Tukey).

Tabla 3. Contenido mineral de los distintos órganos de la planta de cempasúchil tratadas con las diferentes cepas de rizobacterias, donde Ca, Mg, K y P se representan en mg·kg⁻¹ y N en %.

Table 3. Mineral content of the different organs of the marigold plant treated with the different strains of rhizobacteria, where Ca, Mg, K and P are represented in mg·kg⁻¹ and N in %.

Órgano	Tratamientos	Ca	Mg	K	P	N
		mg·kg ⁻¹				%
Raíz	T0	18887 d	3676 b	4672 a	2337 a	1.05 d
	T1	30599 ab	2183 c	2085 bc	1619 d	1.93 c
	T2	29379 bc	4772 a	1297 c	2440 a	2.45 b
	T3	29441 bc	5253 a	709 c	1850 bc	2.98 a
	T4	26109 bcd	1630 c	1413 c	1851 bc	1.05 d
	T5	38189 a	3749 b	3627 ab	2021 b	2.63 ab
	T6	21649 cd	5129 a	4642 a	1476 d	1.93 c
	T7	18622 d	2034 c	4017 a	1831 c	2.80 ab
	CV (%)	11.18	6.88	23.01	3.39	6.2
Tallo	T0	7415 bc	4417 b	12557 d	979 bc	1.05 e
	T1	7397 bc	4987 a	16810 b	839 c	2.28 b
	T2	10484 a	5302 a	16141 bc	1227 a	1.75 c
	T3	8168 b	2594 d	15164 c	933 bc	1.40 d
	T4	7134 bc	2841 c	17358 b	944 bc	2.45 ab
	T5	6508 c	1996 e	19140 a	1022 b	2.63 a
	T6	10537 a	4077 bc	17598 ab	853 bc	1.40 d
	T7	8694 b	2319 de	12913 d	939 bc	1.23 de
	CV (%)	6.66	3.69	3.37	6.22	6.54
Hoja	T0	28656 d	4871 e	7572 d	2029 c	1.75 c
	T1	48349 ab	4577 f	14091 a	2103 bc	3.33 a
	T2	48935 a	6516 b	8557 cd	1824 c	3.33 a
	T3	41463 bc	2502 g	11648 b	1893 c	1.93 c
	T4	35855 c	5679 d	6466 e	1900 c	2.45 b
	T5	36426 c	6135 c	8984 c	1871 c	2.86 b
	T6	35919 c	6012 c	11082 b	2816 a	2.80 b
	T7	36168 c	7920 a	9410 c	1457 b	2.63 b
	CV (%)	6.31	1.27	3.78	5.86	5.9
Pétalos	T0	4448 ab	601 a	13718 ab	3681 c	1.05 e
	T1	3260 b	581 a	12638 ab	3482 c	2.10 c
	T2	4554 ab	577 a	12219 ab	3552 c	2.10 c
	T3	5245 ab	585 a	11698 b	3909 bc	2.28 bc
	T4	4377 ab	598 a	13844 ab	4327 ab	1.40 d
	T5	3742 ab	600 a	14805 a	4743 a	2.45 b
	T6	4164 ab	604 a	13901 ab	3636 c	2.28 bc
	T7	5798 a	663 a	14934 a	3786 c	2.98 a
	CV (%)	17.33	10.46	7.21	4.79	5.2

Donde T0 es el testigo; T1 es *Bacillus* sp.1; T2 es *Bacillus cereus*; T3 es *Bacillus licheniformis*; T4 es la interacción entre *Bacillus* sp.1 y *Bacillus cereus*; T5 es la interacción entre *Bacillus* sp.1 y *Bacillus licheniformis*; T6 es la interacción entre *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*; y T7 es la interacción entre *Bacillus* sp.1, *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$; Tukey).

Los resultados obtenidos sobre la concentración de Mg²⁺ en el cultivo de flor de cempasúchil al aplicar los distintos tratamientos muestran que en la raíz, las concentraciones estadísticamente más altas de Mg²⁺ se presentaron al aplicar *B. licheniformis*, la interacción entre *B. cereus* y *B. licheniformis* y la aplicación individual de *B. cereus*, superiores al testigo un 42.9%, 39.5% y 29.8% respectivamente. En hoja, en la interacción entre las tres cepas, la concentración de Mg²⁺ fue superior al testigo en un 62.6%. Las concentraciones de Mg²⁺ en el tallo estadísticamente más altas se presentaron al aplicar *B. cereus* y *Bacillus* sp. individualmente, superando al testigo en un 20.1% y 13.0%, respectivamente. En cuanto a la concentración de Mg²⁺ en los pétalos, no hubo diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Jiménez-Gómez et al. (2020) no encontraron señales de solubilización de Mg²⁺ por parte de *B. halotolerans*, mientras que en este estudio se presentan especies de *Bacillus* que incrementaron la concentración de Mg²⁺ en el cultivo de *Tagetes erecta*.

Las concentraciones de K⁺ de los órganos principales del cultivo de cempasúchil al inocular los distintos tratamientos dan como resultado que en la raíz el testigo fue el que tuvo la mayor concentración de K⁺ siendo estadísticamente igual a las concentraciones de K⁺ de las raíces de plantas inoculadas con las interacciones de *B. cereus* y *B. licheniformis* y a la interacción entre las tres cepas. En las hojas, prácticamente todos los tratamientos fueron superiores al testigo, con excepción de la interacción entre *Bacillus* sp. y *B. cereus*, siendo la aplicación de *Bacillus* sp. individualmente la que arrojó la concentración de K estadísticamente más alta, siendo un 86.1% superior al testigo. En el tallo todos los tratamientos, excepto la interacción entre las tres cepas, fueron superiores estadísticamente, en cambio los tallos de las plantas inoculadas con la interacción entre *Bacillus* sp. y *B. licheniformis* fueron los que mostraron una concentración de K mayor, un 52.5% superior al testigo. En los pétalos, la interacción entre las tres cepas y la interacción entre *Bacillus* sp. y *B. licheniformis* fueron los tratamientos donde la concentración de K fue la más alta, al ser superiores, respectivamente un 8.9% y 7.9% al testigo. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Somnez et al. (2017).

Las concentraciones de P son más altas con la aplicación de *B. cereus* y el testigo, siendo estadísticamente iguales. En las hojas, la interacción entre la cepa *B. cereus* y *B. licheniformis* es la que presenta la concentración más alta de P siendo un 38.8% superior al testigo. En el tallo, la cepa *B. cereus*, al aplicarse individualmente, mostró la concentración de P más alta, siendo un 25.4% mayor al testigo. Las concentraciones mayores en los pétalos se presentan en las interacciones de las cepas *Bacillus* sp. y *B. licheniformis* y *Bacillus* sp. y *B. cereus*, siendo 28.8% y 17.5% superiores al testigo. El género *Bacillus* tiene la capacidad de solubilizar los fosfatos presentes en el suelo por su capacidad productora de ácidos orgánicos (Glick, 2014).

El contenido de N presente en los diferentes órganos del cultivo de *Tagetes erecta* en todos los órganos, al aplicar cualquiera de los tratamientos con *Bacillus* fue superior esta-

dísticamente al testigo. En la parte radicular, el contenido más alto de N fue en las plantas inoculadas con *B. licheniformis* siendo 183.8% superior al testigo. En las hojas, la aplicación individual de *B. cereus* y *Bacillus* sp. fueron los que mayor concentración de N presentaron, al ser 90.3% mayores al testigo. La concentración estadísticamente más alta de N se observó en la interacción entre *Bacillus* sp. y *B. licheniformis* siendo 150.5% mayor que el testigo. Y en los pétalos, se presentó en la interacción entre las 3 cepas que fue 183.8% superior al testigo. Al momento de aislar las bacterias se utilizó un medio selectivo para bacterias fijadoras de N siendo los resultados concordantes. Se ha demostrado que el género *Bacillus* tiene la capacidad biológica de fijar el Nitrógeno (Kuan *et al.*, 2016).

AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt por la beca proporcionada al autor y a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el apoyo económico brindado para realizar el proyecto de investigación.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la inoculación de las cepas del género *Bacillus* en el cultivo de flor de campasúchil, tienen capacidad solubilizadora de Calcio, además de también solubilizan Fósforo, Magnesio y Potasio, así como fijar Nitrógeno. También la cantidad de carotenoides totales por flor se vio incrementada con la aplicación de PGPR. Los tratamientos que tuvieron mayor relevancia fueron la combinación de las cepas *Bacillus* sp. y *Bacillus licheniformis* y de *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*. Por lo tanto, al inocular el género *Bacillus* se pueden producir flores de campasúchil eliminando el uso de fertilizantes cálcicos convencionales en suelos calcáreos.

REFERENCIAS

- Amereshwar-Reddy, K. y Saravanan, S. 2020. Effect of bio fertilizers on plant growth and flower yield of african marigold *Tagetes erecta*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 9(5): 1334-1338.
- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Castro-Barquero, L., Murillo-Roos, M., Lorío, L. y Mata-Chinchilla, R. 2015. Inoculación al suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (mm) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. Agronomía Costarricense. 39(1): 21-36.
- Chauhan, A., Guleria, S., Balgir, P., Walia, A., Mahajan, R., Mehta, P. y Shirkot, C. 2017. Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. Brazilian Journal of Microbiology, 48(2): 294-304.
- Glick, B. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research. 169: 0-39.
- Hu, W., Tian, S., Di, Q., Duan, S. y Dai, K. 2018. Effect of exogenous calcium on mesophyll cell ultrastructure, gas exchange, and photosystem ii in tobacco (*Nicotiana tabacum* Linn.) under drought stress. Photosyntheticyca. 56(4): 1204-1211.
- Jiménez-Gómez, A., García-Estévez, I., García-Fraile, P., Escribano-Bailón, M. y Rivas, R. 2020. Increase in phenolic compounds of *Coriandrum sativum* L. after the application of a *Bacillus halotolerans* biofertilizer. Journal of the Science of Food and Agriculture. 100(6): 2742-2749.
- Karamat, M. y Ahmed, A. 2018 Impact of *Arthrobacter mysorens*, *Kushneria avicenniae*, *Halomonas* spp. and *Bacillus* sp. on *Helianthus annuus* L. for growth enhancement. The Journal of Animal & Plant Sciences, 28(6): 1629-1634.
- Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. y Shamsuddin, Z. 2016. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. PLoS ONE. 11(3): e0152478.
- Kumar, P., Dubey, R. y Maheshwari, D. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens, Microbiological Research. 167(8): 493-499.
- Labra-Cardón, D., Guerrero-Zúñiga L., Rodríguez T., Montes-Villafán S., Pérez-Jiménez S. y Rodríguez-Dorantes A. 2012. Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 28(1): 7-16.
- Matsumoto, L., Martínez, A., Avanzi, M., Albino, U., Brasil, C., Saridakis, D., Rampazo, L., Zangaro, W. y Andrade, G. 2005. Interactions among functional groups in the cycling of carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. Applied Soil Ecology. 28: 57-65.
- Moliner, C., Barros, L., Dias, M., López, V., Langa, E., Ferreira, I., y Gómez-Rincón, C. 2018. Edible flowers of *Tagetes erecta* L. as functional ingredients: phenolic composition, antioxidant and protective effects on *Caenorhabditis elegans*. Nutrients. 10(12): 2002.
- Petrova, I., Petkova, N. e Ivanov, I. 2016. Five edible flowers – valuable source of antioxidants in human nutrition. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 8(4): 604-610.
- Pourbabae, A., Bahmani, E., Alikhani, H. & Emami, S. 2016. Promotion of wheat growth under salt stress by halotolerant bacteria containing ACC deaminase. Journal of Agricultural Science and Technology. 18: 855-864.
- Radhakrishnan, R. y Lee, I. J. 2016. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. Plant Physiology and Biochemistry. 109: 181-189.
- Rauber, L., Andrade, A., Friederichs, A., Mafra, A., Baretta, D., da Rosa, M., Heberle Mafra, M. y Correa, J. 2018. Soil physical indicators of management systems in traditional agricultural areas under manure application. Scientia Agricola. 75 (4): 354-359.
- Rolaniya, M., Khandelwal, S., Koodi, S., Sepat, S. y Choudhary, A. 2017. Effect of NPK, biofertilizers and plant spacings on growth and yield of african marigold (*Tagetes erecta* Linn.). Chemical Science Review and Letters. 6(21): 54-58.

- Sadzawka, R., Grez, R., Carrasco, M. y Mora, M. 2004. Métodos de análisis de tejidos vegetales. Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia de Suelo. Santiago, Chile.
- Sonmez, F., Alp, S. y Yasar, O. 2017. The effects of humic acid application on the nutrient contents and heavy metals in organs of marigold (*Tagetes erecta* L.). *Gresenius Enviromental Bulletin*. 26(8): 5340-5348.
- Sosa-Pech, M., Ruiz-Sánchez, E., Tun-Suárez, J., Pinzón-López, L. y Reyes-Ramírez, A. (2019). Germinación, crecimiento y producción de glucanasas en *Capsicum chinense* Jacq. Inoculadas con *Bacillus* spp. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 6(16): 137-143.
- Wasti, S., Manaa, A., Mimouni, H., Nsairi, A., Ibtissem, M., Gharbi, E. y Ben Ahmed, H. 2016. Exogenous application of calcium silicate improves salt tolerance in two contrasting tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars. *Journal of Plant Nutrition*. 40(5): 673–684.
- Yan, P., Shen, C., Fan, L., Li, X., Zhang, L., Zhang, L. y Han, W. 2018. Tea planting affects soil acidification and nitrogen and phosphorus distribution in soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 254: 20–25.

Efectos del manejo productivo de un sistema agroforestal en la diversidad de parasitoides asociados (Hymenoptera: Braconidae) en Yucatán, México

Effects of an agroforestry system productive management on the associated diversity of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) in Yucatán, México

Pech Cutis CM, Castillo Sánchez LE, Canul Solís JR, López Coba E, Ruz Febles NM, Campos-Navarrete MJ*

Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tizimin. Final del Aeropuerto Cupul S/N C.P. 97700, Tizimin, Yucatán, México.

RESUMEN

Los sistemas agroforestales tropicales, aunque modifican los ambientes naturales, se proponen como una alternativa de sustentabilidad para la producción de alimentos y la conservación de la biodiversidad. Este trabajo explora cómo se modifica la diversidad de parasitoides entre diferentes áreas, en un escenario fragmentado como lo es un sistema agroforestal. Se encontró que no hay un efecto directo de la diversidad de plantas en el grupo de parasitoides estudiado; pero el número de especies especialistas es alto, lo cual señala que en agroforestales diversificados estos probablemente funcionen como remanente de hábitat natural o como refugio para los parasitoides que se dispersan hacia los diferentes tipos de manejo dentro del agroforestal. Por lo anterior es necesario considerar en futuros estudios los controles ejercidos por los efectos de abajo hacia arriba de la diversidad de plantas, sumando a esto el contexto de las interacciones que ocurren en los sistemas agroforestales.

Palabras clave: agroforestales, biodiversidad, Braconidae, conservación, Yucatán.

ABSTRACT

Although tropical agroforestry systems modify natural environments, they are proposed as a sustainable alternative for food production and biodiversity conservation. This work explores how the diversity of parasitoids is modified between different areas in a fragmented scenario such as an agroforestry system. It was found that there is no direct effect of plant diversity on the group of parasitoids studied. However, the number of specialist species is high, which indicates that in diversified agroforestry, these probably function as a remnant of natural habitat or as a refuge for parasitoids that disperse towards the different types of management within the agroforestry. Therefore, in future studies, it is necessary to consider the controls exerted by the bottom-up effects of plant diversity, adding to this the context of the interactions that occur in agroforestry systems.

Key words: agroecosystems; biodiversity; Braconidae; conservation; Yucatan

INTRODUCCIÓN

Los sistemas agroforestales en los trópicos proporcionan sistemas alternativos para la producción de alimentos, debido a que los sistemas intensivos de producción provocan pérdida de cobertura vegetal, conversión y fragmentación de áreas naturales en los ecosistemas. Estas actividades modifican el hábitat de las especies que dependen de la vegetación, efectos relacionados al área de distribución de la especie y de sus requerimientos de hábitat (Scolozzi y Geneletti, 2012; Campos-Navarrete *et al.*, 2015a). Por otra parte, la velocidad en la pérdida de especies ha aumentado el interés por el estudio de la diversidad biológica en los sistemas agroforestales, principalmente de insectos, debido a que constituyen la fracción más importante de la diversidad de un territorio y prestan múltiples servicios ecológicos a los ecosistemas (Klein *et al.*, 2002). Como la captura de carbono, control de malezas, de plagas y conservación de la biodiversidad (Garbach *et al.*, 2014; Barral *et al.*, 2015).

Los parasitoides tienen un alto número de especies y sus hábitos derivan en servicios de regulación para las poblaciones de sus hospederos (lepidópteros, coleópteros y dípteros) (Shaw y Huddleston, 1991; Abdala-Roberts *et al.*, 2016a). En los sistemas agroforestales, el estudio de estos organismos es interesante desde el punto de vista antropogénico (e.g. control integrado de plagas) y los mecanismos que los regulan (Schmidt *et al.*, 2003; Thies *et al.*, 2005; Nicholls, 2008). En los sistemas agroforestales, la diversidad de especies vegetales posee efectos en la productividad secundaria comparables con los sistemas naturales. Se ha observado que ambientes con mayor diversidad de vegetación promueven incrementos en la riqueza y abundancia en los consumidores (Abdala-Roberts *et al.*, 2016b; Castillo-Sánchez *et al.*, 2019).

El efecto del uso del suelo, en conjunto con la diversidad vegetal asociada a los parasitoides, genera un ambiente más complejo ofreciendo mayor cantidad de refugios y de presas (Russell, 1989; Obermaier *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2016), incrementando la depredación debido a los efectos de "arriba-abajo". Estos efectos deberían ser considerados en el diseño de sistemas productivos (e.g. cultivos) para el control de los hospederos y/o plagas (Russell, 1989; Abdala-Roberts

*Autor para correspondencia: María José Campos Navarrete
 Correo electrónico: maria.campos@ittizimin.edu.mx

Recibido: 19 de enero de 2022

Aceptado: 25 de abril de 2022

et al., 2015; 2016a). Modificando la abundancia de las presas (herbívoros) con las características como la especialización de su dieta (generalistas vs. especialistas) y sus interacciones (Campos-Navarrete *et al.*, 2015b). Se ha observado que en los parasitoides especialistas los efectos de un incremento en la diversidad pueden ser negativos, debido a la baja densidad de su recurso prioritario (Hambäck *et al.*, 2014).

En contraste, en los parasitoides generalistas los efectos de un incremento de la diversidad pueden variar y, en algunos casos, puede ser positivo debido a su dieta mixta y al incremento en la disponibilidad de sitios de refugio (Unsicker *et al.*, 2008; Castagnyrol *et al.*, 2013). Siendo que la presencia de los herbívoros puede mediar su interacción con el siguiente nivel trófico de los consumidores donde se incluyen los parasitoides (Abdala-Roberts *et al.*, 2016b).

El presente trabajo explora el efecto en un sistema agroforestal de producción múltiple en la diversidad de parasitoides (Braconidae). Particularmente cambios en la riqueza, abundancia, similitud entre los sistemas y en las estrategias de parasitismo (koinobiontes=especialistas e idiobiontes=generalistas). Tratando de inferir cómo se modifica la diversidad de parasitoides en ambientes donde la diversidad vegetal es limitada e.g. cultivos y cuando estos son adyacentes a la vegetación secundaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo se realizó en el oriente de Yucatán en el municipio de Tizimín, Yucatán, México. Esta zona se caracteriza por la conversión del uso de suelo de selva nativa a pastizales, para alimento de ganado bovino. La ganadería representa el 30% de la actividad económica de esta zona (INEGI, 2015). El sistema agroforestal se ubica en el área de producción agrícola y pecuaria del TecNM Campus Tizimín, ubicado al final del aeropuerto Cupul s/n C.P. 97700 con las coordenadas 21°09'29" N 88°10'21" O.

El sistema agroforestal cuenta con cuatro sistemas: plantación de *Cocos nucifera* "PC" de 2,106 m² (monocultivo), plantación de *Citrus limon* "PL" de 7,828 m² (monocultivo), pastizal con pasto estrella *Cynodon sp.* "PT" de 10,346 m² y Vegetación secundaria con más de 30 años de recuperación "VS" de 6,515 m². Los sistemas se encuentran a una distancia promedio de 500 m entre cada uno, para garantizar la independencia de las muestras. Este contraste en un espacio limitado provee un escenario frecuente en la actualidad, originado por los procesos de fragmentación, originando sitios contrastantes.

Trabajo de campo

Se utilizaron trampas tipo malaise, ampliamente recomendadas y utilizadas para capturar himenópteros parasíticos (Noyes, 1982; Nieves-Aldrey y Castillo, 1991). La orientación de la trampa fue de norte a sur, debido a que es más efectiva si se colocan las aberturas en posición de donde proviene el viento. Las trampas se colocaron lejos de los bordes de cada sistema, con la finalidad de reducir el efecto

de borde. Las trampas permanecieron activas todos los días de octubre 2015 - marzo 2016, fueron revisadas cada quince días y los especímenes colocados en frascos con alcohol al 70%.

Identificación de los especímenes

Los especímenes fueron montados de acuerdo con la técnica tradicionalmente usada para estos organismos. La identificación se llevó a cabo mediante la ayuda de la clave taxonómica para Braconidae (Wharton *et al.*, 1997).

El material se determinó hasta nivel taxonómico de género, se utilizó el concepto de morfoespecie para identificar y separar a los individuos que presentan características morfológicas diferentes debido a la dificultad existente para determinar los parasitoides a nivel específico (Simpson, 1961; Mayr y Ashlock, 1991; Delfín y Burgos, 2000). Además, se clasificó a las morfoespecies de acuerdo a sus estrategias de parasitismo (koinobiontes=especialistas e idiobiontes=generalistas), con ayuda de bibliografía especializada (Goulet y Huber, 1993). Todo el material colectado se encuentra resguardado en el TecNM Campus Tizimín.

Análisis de datos

Se realizó un análisis de diversidad en la comunidad de braconidos en los cuatro sistemas utilizando el índice de diversidad de Shannon-Wiener. Este expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra; asume que todos los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra (Ludwing y Reynolds, 1988; Magurran, 1988).

La similitud entre los sistemas se estimó utilizando el índice de Sorensen (Krebs, 1989) basado en la presencia/ausencia de especies y en el número de especies, comunes o raras (Spellerberg, 1991).

Para estimar la representatividad de la riqueza de especies de las muestras en cada sistema se utilizó el programa EstimateS versión 9. Se utilizaron los estimadores de riqueza ICE basado en el número de especies raras (las observadas en menos de 10 unidades de muestreo) y Jackknife de primer orden basado en el número de especies únicas (uniques) (Colwell y Coddington, 1994).

Con los datos de las morfoespecies registradas usando Abundancia relativa, como la variable de respuesta, se evaluó el cambio entre los cuatro sistemas. Esto a través de un modelo que explora la respuesta cuantitativa de los braconidos a los sistemas. Este modelo usó como factor principal el sistema con cuatro niveles (PC, PL, PT, VS). El segundo modelo exploró las estrategias de parasitismo de las especies de braconidos, usando como factor principal estrategia de parasitismo con dos niveles (Idiobiontes "I" y Koinobiontes, "K"), con relación a la abundancia. El tercer modelo exploró la interacción entre los dos factores principales mencionados anteriormente en la abundancia relativa de braconidos. Los modelos evaluados se ajustaron con el método de Penalizado de Cuasi-Verosimilitud, y se analizaron con GLMM (Modelo Mixtos Lineales Generalizados) usando el programa

estadístico R v. 3.01. (R Core Team 2020). Se usaron contrastes a posteriori para probar si existieron diferencias significativas para un factor y entre niveles de cada uno (Crawley, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Riqueza y Abundancia total

Se colectó un total de 2,031 ejemplares de braconídeos pertenecientes a 20 subfamilias, 47 géneros y 140 morfoespecies. La subfamilia Microgastrinae representó el 49% del total de los individuos capturados, seguidos de Doryctinae y Hormiinae con 8% y 6% respectivamente, Ichneutinae y Macrocentrinae tuvieron un individuo, equivalente al 0.05% (Tabla 1).

Se encontró 47 géneros, lo que constituye el 24% de lo registrado para Yucatán donde se reportan 194 géneros; esto se explica porque el estado es muy cercano al Golfo de México y es uno de los estados donde laboran los especialistas nacionales y extranjeros y/o donde se han realizado más recolectas (Coronado y Zaldívar, 2014).

Se sugiere que el alto porcentaje de Microgastrinae, se debe a que son braconídeos con un amplio rango de hospederos, que atacan a casi todas las familias de Lepidoptera, excepto la familia Hepialidae (Shaw, 1994), e incluye especies de tamaño pequeño y con colores oscuros que posiblemente los ayude a no ser vistos por sus depredadores (Rabinowitz y Price, 1976; Hawkins *et al.*, 1992).

Ichneutinae y Macrocentrinae tuvieron un solo individuo, esto concuerda con lo predicho para estas sub-

familias que estima existen entre 100 -300 especies a nivel mundial (Jones *et al.*, 2009). En México, para Ichneutinae, se han reportado ocho géneros y 12 especies determinadas y sin determinar dos géneros y 14 morfoespecies. Para Macrocentrinae, se tiene reportado cuatro géneros y siete especies determinadas y sin determinar un género y ocho morfoespecies (Coronado-Blanco y Zaldívar-Riverón, 2014). En un estudio en Yucatán, se encontraron dos géneros y dos morfoespecies para Ichneutinae y Macrocentrinae (Castillo-Sánchez *et al.*, 2019).

Riqueza y abundancia de especies por sistema

La mayor riqueza de subfamilias y géneros se registró en PL, seguida por PC, VS y PT. Las morfoespecies y el número de individuos fueron mayor en PL, seguido por PC, PT y VS (Tabla 1). Se observó que, en PL y PC, considerados monocultivos concentraron el mayor número de individuos y de riqueza taxonómica; seguida por VS y por PT.

El mayor número de especies raras fue en PT, seguido de PL, PC y VS. En especies únicas, de mayor a menor se encontraron en PC, PT, PL y VS (Tabla 2). En general se observa que VS considerada un policultivo y con mayor complejidad fue la que menor número de especies raras y únicas presentó. Esto contrasta con lo encontrado para el índice de diversidad de Shannon-Wiener, donde la mayor diversidad se observó en PL, seguido de VS, PC y PT (Tabla 2).

Estos resultados no coinciden en estudios previos en sistemas de cultivos y sistemas agroforestales donde la

Tabla 1. Número de géneros (G), morfoespecies (S) y abundancia (A) por subfamilias en cada sistema. PC= Plantación de Coco, PL= Plantación de Limón, PT= Pastizal, VS= Vegetación Secundaria y el Total, en el sistema agroforestal.

Table 1. Number of genera (G), morphospecies (S) and abundance (A) by subfamilies in each system. PC= Coconut Plantation, PL= Lemon Plantation, PT= Grassland, VS= Secondary Vegetation and the Total, in the agroforestry.

Subfamilia	PC			PL			PT			VS			Total	
	G	S	A	G	S	A	G	S	A	G	S	A	A	S
Agathidinae	2	5	32	2	4	24	3	5	6	2	2	4	66	8
Alysiinae	1	1	3	4	4	33	2	2	2	2	2	5	43	5
Aphidiinae	-	-	-	-	1	78	-	-	-	-	-	-	78	1
Blacinae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	7	7	2
Braconinae	3	5	44	4	6	39	3	5	7	1	1	3	93	7
Cardiochilinae	-	-	-	1	2	18	-	1	1	-	1	1	20	2
Cheloninae	2	6	11	3	9	63	2	5	9	2	3	5	88	16
Doryctinae	4	10	19	6	24	95	3	9	25	2	14	24	163	31
Euphorinae	3	3	4	3	4	25	1	1	2	1	1	2	33	6
Homolobinae	-	-	-	2	2	6	2	2	2	-	-	-	8	3
Hormiinae	4	7	17	7	15	84	2	2	8	5	7	11	120	16
Ichneutinae	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1
Macrocentrinae	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Mendesellinae	1	1	2	1	1	7	-	-	-	-	-	-	9	1
Meteorinae	1	1	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-	2	1
Microgastrinae	-	18	247	-	19	572	-	19	121	-	10	46	986	23
Miracinae	1	1	4	1	1	17	-	-	-	1	1	6	27	1
Opiinae	1	5	47	1	7	143	1	4	6	1	4	39	35	7
Orgilinae	2	2	5	1	1	4	1	2	4	2	2	4	17	4
Rogadinae	2	2	10	2	3	23	-	-	-	1	1	1	34	4
Total	28	68	447	39	104	1232	21	58	194	21	51	158	2031	140

Tabla 2. Índice de diversidad de Shannon-Wiener, Número total de morfoespecies, Singletons, Doubletons, Especies únicas y especies raras en los sistemas. PC plantación de coco; PL plantación de limón; PT pastizal y VS vegetación secundaria en el sistema agroforestal.

Table 2. Shannon-Wiener diversity index, Total number of morphospecies, Singletons, Doubletons, Unique species and rare species in the systems. PC coconut plantation; PL lemon plantation; PT grassland and VS secondary vegetation in the agroforestry.

	PC	PL	PT	VS
Índice de Shannon-Wiener	3.43	3.77	3.41	3.45
Número total de especies	68	104	58	51
Especies sencillas (Singletons)	28	25	28	20
Especies dobles (Doubletons)	7	13	12	14
Especies únicas (Uniques)	35	31	32	30
Especies raras	35	38	40	34

mayor riqueza y abundancia se ha encontrado en vegetación secundaria y huertos familiares (Castillo-Sánchez *et al.*, 2019; Chay-Hernandez *et al.*, 2006).

Estimación de riqueza específica

De acuerdo con el ICE se capturó en promedio para el sistema agroforestal el 60% de las especies, mientras que para el Jacknife de primer orden se capturó el 70% de acuerdo con lo estimado para el sistema agroforestal (Tabla 3). Se considera que esta estimación es adecuada, ya que en otros estudios se ha reportado que para los braconidos es de 53% en cultivos rodeados de vegetación secundaria (Chay-Hernandez *et al.*, 2006).

Similitud de las comunidades

El índice de Sorensen indicó que los sistemas que presentaron la mayor similitud fueron PC con VS, seguidos por PT con VS, en tercer lugar, PL con VS y los que presentaron la menor similitud fueron PC con PT (Tabla 4). Esto señala la importancia de conservar remanentes de vegetación secundaria en los sistemas agroforestales, ya que se observó que VS es similar a los cultivos, lo que se ha observado en otros sistemas agroforestales en Yucatán (Castillo-Sánchez *et al.*, 2019).

En este sistema agroforestal queda por explorar el papel de la abundancia de los herbívoros, que ha sido señalada en otros casos, como un factor que sugiere que la presencia de los herbívoros afecta el número de parasitoides

Tabla 3. Estimadores de riqueza ICE y Jacknife de primer orden (Jacknife 1), respecto a las morfoespecies capturadas, calculados en los sistemas de PC plantación de coco; PL plantación de limón; PT pastizal y VS vegetación secundaria en el sistema agroforestal.

Table 3. ICE and first order Jacknife (Jacknife 1) wealth estimators, with respect to the morphospecies captured, calculated in the systems of PC coconut plantation; PL lemon plantation; PT grassland and VS secondary vegetation in the agroforestry.

	PC	PL	PT	VS
Morfoespecies capturadas	68	104	58	51
ICE	120	129	103	94
% Capturado de ICE	57%	81%	56%	54%
Jacknife 1	97	130	85	76
% Capturado de Jacknife 1	70%	80%	68%	67%

Tabla 4. Similitud de la comunidad de braconidos en los sistemas de PC plantación de coco; PL plantación de limón; PT pastizal y VS vegetación secundaria en el sistema agroforestal.

Table 4. Braconid community similarity in the systems of PC coconut plantation; PL lemon plantation; PT grassland and VS secondary vegetation in the agroforestry.

	PC	PL	PT	VS
PC	-	0.41	0.33	0.65
PL	-	-	0.49	0.54
PT	-	-	-	0.58
VS	-	-	-	-

y la densidad de su población respecto al paisaje, el clima y el manejo (Koricheva *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2003). Lo cual señala que la presencia de herbívoros en los cultivos, ocasionado por la concentración de un solo recurso repercutirá en la incidencia de ciertas plagas, que resultan en una fuente importante para la atracción de ciertos parasitoides, incrementando la abundancia de los consumidores como lo propone la Hipótesis de Más Individuos (Srivastava y Lawton, 1998).

Por otra parte, el policultivo (VS) puede presentar mayor diversidad vegetal que los otros sistemas, probablemente funcione como hábitat natural o refugio para los parasitoides que se dispersan hacia los diferentes tipos de manejo dentro del sistema agroforestal (Thies y Tschardtke, 1999) lo cual debe explorarse.

Efecto del sistema en la abundancia

En cuanto a la respuesta cuantitativa en la abundancia relativa en el sistema y la estrategia de parasitismo de los braconidos, se observó que el sistema tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la abundancia ($F_{1,3} = 2.8125$ $p = 0.000$). Se observaron valores mayores de abundancia relativa en PC, PT y VS respecto a PL (Figura 1). En cuanto a la estrategia de parasitismo se encontró un efecto significativo en la abundancia ($F_{1,2} = 8.5947$ $p = 0.000$), siendo mayor en koinobiontes respecto a los idiobiontes (Figura 2). Sin embargo, no se encontró un efecto de interacción entre el sistema y la estrategia de parasitismo ($F_{1,1} = 0.6097$ $p = 0.65$), en el sistema agroforestal.

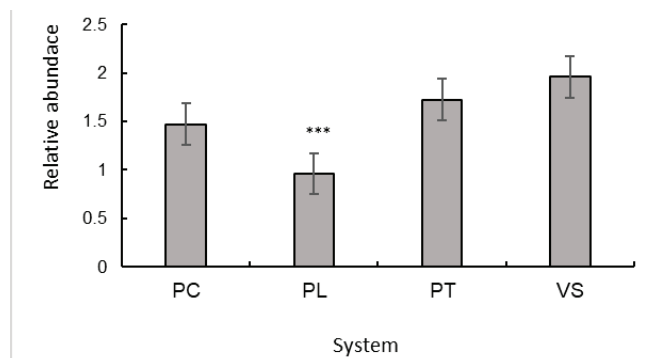


Figura 1. Abundancia relativa promedio ($EE \pm$) de las morfoespecies de braconidos por sistemas. PC plantación de coco; PL plantación de limón; PT pastizal y VS vegetación secundaria en el sistema agroforestal (***) $p < 0.05$).
Figure 1. Average relative abundance ($EE \pm$) of braconid morphospecies per system. PC coconut plantation; PL lemon plantation; PT grassland and VS secondary vegetation in the agroforestry (***) $p < 0.05$).

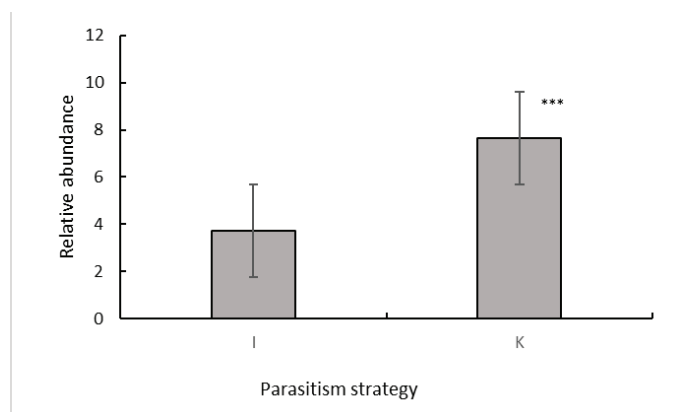


Figura 2. Abundancia promedio relativa por estrategia de parasitismo (EE \pm) de las morfoespecies de braconidos en el sistema agroforestal (***) $p < 0.05$).

Figure 2. Relative average abundance by parasitism strategy (EE \pm) of braconid morphospecies in the agroforestry (***) $p < 0.05$.

Con los datos obtenidos en este sistema agroforestal se pudo observar que los monocultivos (e.g. PL), presentaron mayor diversidad de especies, en cuanto a riqueza taxonómica y abundancia de individuos. Sin embargo, para himenópteros parasitoides considerados “enemigos especializados”, estos no son afectados por la manipulación de la diversidad de plantas (Koricheva *et al.*, 2000; Abdala-Roberts *et al.*, 2016a).

Proporción de la estrategia de parasitismo

Koinobionte representó el 63%, 36% se clasificó como Idiobionte y el 1% corresponde al registro de una morfoespecie del género *Epsilogaster* (Mendesellinae) del cual se desconoce su estrategia. El porcentaje de koinobiontes más alto se presentó en PT, seguido de PC, VS y PL. Los idiobiontes con los porcentajes más altos e iguales PL y VS, seguidos por PC y PT (Tabla 5). Este resultado sugiere que en un sistema agroforestal, las especies de braconidos especialistas son más abundantes, principalmente en los monocultivos; y los generalistas se concentran en los sistemas de mayor complejidad como la vegetación secundaria.

En este sistema agroforestal se encontró que el mayor número de individuos se clasificaron como koinobiontes y que la presencia de estos es independiente del sistema de cultivo. Un mecanismo que podría explicar los patrones encontrados en este sistema agroforestal puede ser “mecanismo de más especialización” (Obermair *et al.*, 2008) que indica la especialización previene la competencia, así que comunidades productivas sustentan un mayor número de especies.

Los resultados corresponden a lo reportado por Askew y Shaw (1986), Hawkins (1994), Ruiz-Guerra *et al.* (2014), Rodríguez-Solis *et al.* (2016) donde indican que la comunidad de braconidos está dominada por parasitoides koinobiontes, menciona que la especialidad del huésped no está relacionada con el grado de perturbación y por ello los parasitoides koinobiontes pueden ocurrir tanto en la etapa temprana como en la fase sucesional tardía de la vegetación.

Tabla 5. Estrategias de parasitismo y morfoespecies en las que no se conoce (?=desconocida) expresadas en total y porcentaje para PC plantación de coco; PL plantación de limón; PT pastizal y VS vegetación secundaria en el sistema agroforestal.

Table 5. Strategies of parasitism and morphospecies which are unknown (?), expressed in total and percentage for PC coconut plantation; PL lemon plantation; PT grassland and VS secondary vegetation in the agroforestry.

	PC	%	PL	%	PT	%	VS	%
Koinobiontes	45	66	58	56	42	72	29	57
Idiobiontes	22	32	45	43	16	28	22	43
?	1	2	1	1	-	-	-	-
Total	68	100	104	100	58	100	51	100

Se considera que los braconidos son de gran importancia por su participación y utilización en los programas de control biológico de plagas forestales, frutales, hortalizas y de cultivos extensivos en todo el mundo (Coronado *et al.*, 2010). Pero los mecanismos de esta posible regulación en sistemas manejados son poco explorados, particularmente en los sistemas agroforestales que poseen altos niveles de diversidad vegetal y mantienen altos niveles de biodiversidad, con cambios abióticos y bióticos que pueden afectar las comunidades de insectos (Klein *et al.*, 2002).

Finalmente se debe considerar en futuros trabajos experimentales los controles ejercidos por los efectos de abajo hacia arriba de la diversidad de plantas y los de arriba hacia abajo de los consumidores. Sumando a esto el contexto de las interacciones que ocurren en los sistemas agroforestales debe ser estudiado con respecto a las comunidades (e.g. insectos, animales) asociados en los diferentes niveles tróficos y el papel funcional que toman en estos sistemas.

CONCLUSIONES

La subfamilia Microgasterinae fue la más abundante. El sistema PL presentó la mayor riqueza de subfamilias y géneros. La VS fue la que mayor similitud presentó con respecto a los otros sistemas. En cuanto a la abundancia y el sistema se encontró un efecto significativo y fue claro que la estrategia de parasitismo koinobionte fue mayor.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el TecNM a través de los siguientes proyectos: 10396.21-P; 6581-18P; 6194.17P.

REFERENCIAS

- Abdala-Roberts, L., González-Moreno, A., Mooney, K.A., Moreira, X., González-Hernández, A. y Parra-Tabla, V. 2016a. Effects of tree species diversity and genotypic diversity on leafminers and parasitoids in a tropical forest plantation. *Agricultural and Forest Entomology*. 18: 43-51.
- Abdala-Roberts, L., Hernández-Cumplido, J., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., Benrey, B. y Moreira, X. 2016b. Effects of plant intraspecific diversity across three trophic levels: Underlying mechanisms and plant traits. *American Journal of Botany*. 103: 1810-1818.
- Abdala-Roberts, L., Mooney, K.A., Quijano-Medina, T., Campos-Navarrete, M.J., González-Moreno, A. y Parra-Tabla, V. 2015. Comparison of tree genotypic diversity and species diversity

- effects on different guilds of insect herbivores. *Oikos*. 124: 1527-1535.
- Barral, M.P., Benayas, J.M.R., Meli, P. y Maceira, N.O. 2015. Quantifying the impacts of ecological restoration on biodiversity and ecosystem services in agroecosystems: A global meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 202: 223-231.
- Campos-Navarrete, M.J., Munguía-Rosas, M.A., Abdala-Roberts, L., Quinto, J. y Parra-Tabla, V. 2015a. Effects of tree genotypic diversity and species diversity on the arthropod community associated with big-leaf mahogany. *Biotropica*. 47: 579-587.
- Campos-Navarrete, M.J., Abdala-Roberts, L., Munguía-Rosas, M.A. y Parra-Tabla, V. 2015b. Are tree species diversity and genotypic diversity effects on insect herbivores mediated by ants?. *Plos One*. 10: e0132671.
- Chay-Hernández, D.A., Delfín-González, H. y Parra-Tabla, V. 2006. Ichneumonoidea (Hymenoptera) community diversity in an agricultural environment in the state of Yucatan, Mexico. *Environmental entomology*. 35: 1286-1297.
- Castagnyrol, B., Giffard, B., Péré, C. y Jactel, H. 2013. Plant apparency, an overlooked driver of associational resistance to insect herbivory. *Journal of Ecology*. 101: 418-429.
- Castillo-Sánchez, L.E., Jiménez-Osornio, J.J., Delfín-González, H., Ramírez Pech, J., Canul-Solís, J.R., González-Moreno, A. y Campos-Navarrete, M.J. 2019. Diversity of Ichneumonoidea (Hymenoptera) in three types of land use in a multiple production agroecosystem in Xmatkuil, Yucatan, Mexico. *Revista Bio Ciencias*. 6.
- Colwell, R.K. y Coddington, J.A. (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 345: 101-118.
- Coronado-Blanco, J.M., Ruiz-Cancino, E., López-Martínez, V., Sánchez-García, J.A., Figueroa-De la Rosa, J.I. y Delfín-González, H. 2010. Braconidae (Hymenoptera) en México. II Taller Internacional de Recursos Naturales.
- Coronado-Blanco, J.M. y Zaldívar-Riverón, A. 2014. Biodiversidad de Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 372-378.
- Coronado-Blanco, J.M. 2011. Braconidae (Hymenoptera) de Tamaulipas, México. Primera edición. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Facultad de Ingeniería y Ciencias. Cd. Victoria, Tamaulipas, México.
- Crawley M.J. 2007. *The R book*. 1st ed. Chichester: John Wiley y Sons Ltd. New York.
- Delfín, G.H. y Burgos R., D. 2000. Los braconidos (Hymenoptera: Braconidae) como grupo parámetro de biodiversidad en las selvas deciduas del trópico: una discusión acerca de su posible uso. *Acta Zoológica Mexicana*. 79: 43-56.
- Garbach, K., Milder, J.C., Montenegro, M., Karp, D.S. y DeClerck, F.A.J. 2014. Biodiversity and ecosystem services in agroecosystems. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. 2: 21-40.
- Goulet, H. y Huber, J.T. 1993. *Hymenoptera of the world: and identification guide to families*. 1st ed. Canada Communication Group. Ottawa, Canada.
- Hambäck, P.A., Inouye, B.D., Andersson, P. y Underwood, N. 2014. Effects of plant neighborhoods on plant-herbivore interactions: resource dilution and associational effects. *Ecology*. 95: 1370-1383.
- Hawkins, B.A., Shaw, M. R. y Askew, R.R. 1992. Relations among assemblage size, host specialization, and climatic variability in North American parasitoid communities. *The American Naturalist*. 139: 58-79.
- Inegi. Encuesta Intercensal. [Consultado 23 agosto 2020] 2015. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/programas/intercensal/2015/>
- Jones, O.R., Purvis, A., Baumgart, E. y Quicke, D.L. 2009. Using taxonomic revision data to estimate the geographic and taxonomic distribution of undescribed species richness in the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Insect Conservation and Diversity*. 2: 204-212.
- Klein, A.M., Steffan-Dewenter, I., Buchori, D. y Tscharncke, T. 2002. Effects of land-use intensity in tropical agroforestry systems on coffee flower-visiting and trap-nesting bees and wasps. *Conservation Biology*. 16: 1003-1014.
- Koricheva, J., Mulder, C.P., Schmid, B., Joshi, J. y Huss-Danell, K. 2000. Numerical responses of different trophic groups of invertebrates to manipulations of plant diversity in grasslands. *Oecologia*. 125: 271-282.
- Krebs, C. J. 1989. *Ecological Methodology*. 2nd ed. Harper Collins. New York, USA.
- Ludwing, J.A. y Reynolds, J.F. 1988. *Statistical ecology. A primer on methods and computing*. 1st ed. John Wiley and Sons. USA.
- Magurran, A. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. 1st. Princeton University Press. New Jersey, USA.
- Mayr, E. y Ashlock, P.D. 1991. *Principles of systematic zoology*. 2nd ed. McGraw Hill. New York, USA.
- Moreira, X., Abdala-Roberts, L., Rasmann, S., Castagnyrol, B. y Mooney, K.A. 2016. Plant diversity effects on insect herbivores and their natural enemies: current thinking, recent findings, and future directions. *Current Opinion in Insect Science*. 14: 1-7.
- Nicholls, C.I. 2008. *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Primera edición. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Nieves-Aldrey, J.L. y Rey del Castillo, C. 1991. Ensayo preliminar sobre la captura de insectos por medio de una trampa "Malaise" en Sierra de Guadarrama (España), con especial referencia a los himenópteros (Insecta, Hymenoptera). *Ecología*. 5: 383-403.
- Noyes, J.S. 1982. Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Natural History*. 16: 315-334.
- Obermaier, E., Heisswolf, A., Poethke, H.J., Randlkofer, B. y Meiners, T. 2008. Plant architecture and vegetation structure: two ways for insect herbivores to escape parasitism. *European Journal of Entomology*. 105: 233-240.
- R Core Team (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rabinowitz, B.J. y Price, P.W. 1976. Anomalous diversity of tropical Icterinae parasitoids: a predation hypothesis. *The American Naturalist*. 110: 889-893.
- Rodríguez-Solís, B.A., Trejo-Rivero, J.A., Nava-Guizar, R.J. y González-Moreno, A. 2016. Variación espacial de subfamilias de braconidos (Hymenoptera: Ichneumonoidea) en una reserva privada del estado de Yucatán, México. *Entomología Mexicana*. 3: 555-559.

- Ruiz-Guerra, B., López-Acosta, J.C., Zaldivar-Riverón, A. y Velázquez-Rosas, N. 2015. Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) abundance and richness in four types of land use and preserved rain forest in southern Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86: 164-171.
- Russell, E.P. 1989. Enemies hypothesis: a review of the effect of vegetational diversity on predatory insects and parasitoids. *Environmental Entomology*. 18: 590-599.
- Schmidt, M.H., Lauer, A., Purtauf, T., Thies, C., Schaefer, M. y Tschardtke, T. 2003. Relative importance of predators and parasitoids for cereal aphid control. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 270: 1905-1909.
- Scolozzi, R. y Geneletti, D. 2012. A multi-scale qualitative approach to assess the impact of urbanization on natural habitats and their connectivity. *Environmental Impact Assessment Review*. 36: 9-22.
- Shaw, M.R. y Huddleston, T. 1991. Classification and biology of braconid wasps. (Hymenoptera: Braconidae). *Handbooks for the identification of British insects*. 1st ed. Royal entomological society of London. London.
- Simpson, G. G., 1961. *Principles of animal taxonomy*. 2nd ed. Columbia University Press. New York, USA.
- Spellerberg, I.F. 1991. A Biological and ecological basis for monitoring. *Elements of ecology and ecological methods*. En: *Monitoring Ecological Changes*. Spellerberg, I. F. (Ed.), pp: 61-90. Cambridge University Press. Cambridge.
- Srivastava, D.S. y Lawton, J.H. 1998. Why more productive sites have more species: an experimental test of theory using tree-hole communities. *The American Naturalist*. 152: 510-529.
- Thies, C. y T. Tschardtke. 1999. Landscape structure and biological control in agroecosystems. *Science*. 285: 893-895.
- Thies, C., Roschewitz, I. y Tschardtke, T. 2005. The landscape context of cereal aphid-parasitoid interactions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 272: 203-210.
- Unsicker, S.B., Oswald, A., Köhler, G. y Weisser, W.W. 2008. Complementarity effects through dietary mixing enhance the performance of a generalist insect herbivore. *Oecologia*. 156: 313-324.
- Wharton, R.A., Marsh, P.M. y Sharkey, M.J. 1997. *Manual of the New World genera of the family Braconidae (Hymenoptera)*. 1 ed. International Society of Hymenopterists. New York, USA.