



Biotecnia

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



THOMSON REUTERS

e-revist@s

PERIÓDICA
ÍNDICE DE REVISTAS LATINOAMERICANAS EN CIENCIAS

indexada en

latindex

IC Journal
Master List

reDalyC.org

SciELO

Miembro de

Crossref



BIOTECNIA, 2022, 24, Issue 3 (September – December), is a quarterly electronic publication edited by the University of Sonora, through the Division of Biological and Health Sciences, with address at Blvd. Luis Encinas y Rosales s/ n, Col Centro, Hermosillo, Sonora, México, C.P.83000, <https://www.biotecnia.unison.mx>, e-mail: biotecnia.difusion@unison.mx. Editor responsible for the issue: Enrique Márquez Ríos.

Reservation of Rights to Exclusive Use 004-2022-061515171200-102. ISSN: 1665-1456; both awarded by the National Copyright Institute. The opinions expressed by the authors do not necessarily reflect the position of the editor of the publication. Total or partial reproduction of the contents and images in this publication is authorized, as long as the editor's authorization is obtained and the source is fully cited.



Biotecnia is licensed under the Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International license (CC BY-NC-SA 4.0)

Content

Type	Pages	Article
Original	pp 5-14	The nutritive solution, vermicompost and mycorrhizae on the yield and quality of <i>Lilium hybrida</i> 'Indian Summerset'
Original	pp 15-21	Hydrodynamic characterization of the Green and Ampt model in a soil with organic improvers
Original	pp 22-27	Hydrodynamic effect and corn (<i>Zea mays L.</i>) production in a clay loam soil with the application of an organic additive in Guasave, Sinaloa, Mexico
Original	pp 28-34	Raw cow's milk used for the production of artisanal products: microbiological and physicochemical quality
Original	pp 35-41	Infiltration evaluation with TDR-300 equipment and the model Green and Ampt, in soil with organic additive in Guasave, Sinaloa, Mexico
Original	pp 42-51	Agronomic evaluation of promising sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i>) germplasm in the department of Valle del Cauca, Colombia
Original	pp 52 - 62	Elaboration of edible starch films using CaCO ₃ nanoparticles and plasticizers by optimized extrusion-casting process
Original	pp 63-69	Analysis of the climatic niche of <i>Coryphantha durangensis</i> (Runge ex Schum.) Britton y Rose, 1923, and identification of potential zones for its conservation in the face of climate change
Original	pp 70-76	Technical – economic indicators for production of tomato crop under protected agriculture in the Comarca Lagunera, Mexico
Original	pp 77 - 86	Phenolic compounds, antihemolytic, anti-inflammatory and antibacterial activity of propolis from southern Sonora
Original	pp 87-93	Production of extracellular lipase by <i>Enterococcus faecium</i> E68 with olive oil waste as substrate
Original	pp 94-100	Chemical and functional characterization of raw and cooked bean flours from the Pinto Saltillo and Black varieties, from the State of Durango
Original	pp 101 - 106	Physicochemical characterization, antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of purple prickly pear (<i>Opuntia gosseliniana</i>) at two stages of coloration

Original	pp 107-114	Development of a biomaterial based on starch-gelatin blends: Physical, mechanical and barrier properties
Original	pp 115-122	Impact of the nutritive solution electrical conductivity on lettuce biomass, photosynthetic pigments and nitrogen compounds
Original	pp 123-131	Effect of microbial inoculants on bioactive compounds and antioxidant activity of xcat'ik pepper (<i>Capsicum annuum L.</i>)
Original	pp 132-139	Surveillance of bacterial resistance to antibiotics in health units in Hermosillo and Ciudad Obregon, Sonora, Mexico
Original	pp 140-149	Genetic and molecular analysis of starch physicochemical properties and its relationship with endosperm modification in quality protein maize
Original	pp 150-158	Identification of rhizobacteria isolated from <i>Tagetes coronopifolia</i> and <i>Tagetes terniflora</i> (Marigold) and evaluation of their <i>in vitro</i> inhibitory capacity against phytopathogenic microorganisms
Original	pp 159-168	Coatings based on sodium alginate extracted from <i>Sargassum fluitans</i> and silver nanoparticles to prolong the shelf life of papaya (<i>Carica papaya L.</i>)

La solución nutritiva, vermicomposta y micorrizas sobre el rendimiento y calidad de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset'

The nutritive solution, vermicompost and mycorrhizae on the yield and quality of
Lilium hybrida 'Indian Summerset'

Cárdenas-Hidalgo D¹, Urbina-Sánchez E^{1*}, Valdez-Aguilar LA², Alejo-Santiago G³, Vázquez-García LM¹, Reyes-Alemán JC¹

¹ Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México. Carretera Tenancingo - Villa Guerrero Km. 1.5, 52400 Tenancingo, Méx.

² Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila. Calz Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315 Saltillo, Coah.

³ Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias. Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit. Unidad Académica de Agricultura. Carretera Tepic-Compostela. Km. 9.0 Xalisco. Nayarit. CP 63780.

RESUMEN

Lilium es de los cultivos más importantes en el Estado de México, sus altos volúmenes de producción, asociados al uso de grandes cantidades de fertilizantes químicos, incrementan salinidad y alteran las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo. El objetivo fue evaluar el efecto de las concentraciones de amonio en la solución nutritiva, el suministro de vermicomposta y micorrizas, así como sus interacciones, sobre el crecimiento y calidad de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'. Se plantaron bulbos en cajas con suelo franco arenoso, con o sin vermicomposta y con o sin micorrizas. Los riegos se realizaron con la solución de Steiner a 0.24 atm con tres relaciones de nitrato:amonio 100:0 %, 92.5:7.5 % y 87.5:12.5 %, y se compararon con fertilización convencional. Se conformó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x2x2, los factores fueron amonio, vermicomposta y micorrizas. La solución nutritiva con 12.5 % de amonio incrementó altura de planta, peso seco, la concentración de K en hoja, y adelantó la floración y punto de corte. El aporte de vermicomposta y micorrizas no afectaron las variables de calidad. La vermicomposta al 5 % incrementó la concentración de nitrógeno y potasio en hojas.

Palabras clave: nutrición vegetal, amonio, nitratos, micorrizas, vermicomposta.

ABSTRACT

Lilium is one of the most important crops in the State of Mexico. Its high production volumes, associated with the use of large amounts of chemical fertilizers, increases soil salinity and alter its physical-chemical and biological properties. The objective was to evaluate the effect of ammonium concentrations in the nutrient solution, vermicompost and mycorrhizae supplies, as well as their interactions, on the growth and quality of *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'. Bulbs were planted in boxes with sandy loam soil, with or without vermicompost and/or mycorrhizae. Irrigation was carried out with Steiner's solution at 0.24 atm with three nitrate:ammonium ratios of 100:0 %, 92.5:7.5 %

and 87.5:12.5 %, comparing with conventional fertilization. A completely randomized design was conformed with a 4x2x2 factorial arrangement, the factors were ammonium, vermicompost and mycorrhizae. The nutritive solution with 12.5 % ammonium increased plant height, dry weight, the K concentration in leaf, and advanced flowering and cut-off point. The contribution of vermicompost and mycorrhizae to the soil did not show significant differences in the quality variables. Vermicompost at 5 % increased the concentration of nitrogen and potassium in leaves.

Key words: plant nutrition, ammonium, mycorrhizae, nitrates, vermicompost.

INTRODUCCIÓN

El *Lilium* es una flor muy apreciada por su belleza, amplia gama de colores y por su variada utilidad en ramos, floreros, composiciones florales y jardines, características que han hecho que se incremente su demanda en el mercado. Es uno de los cultivos florícolas más importantes en el Estado de México, porque genera grandes volúmenes de producción. El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2020) reporta en el cierre de la producción agrícola 2020 que el valor de la producción de *Lilium* a nivel nacional fue de \$ 169,119,238 en una superficie cosechada de 270.18 Ha, el corredor florícola del Estado de México aportó 75.06 % del valor de producción, \$ 126,945,612 respecto del total nacional.

Los altos volúmenes de producción de *Lilium* pueden estar asociados al uso de grandes cantidades de fertilizantes químicos que provocan el incremento de la salinidad del suelo alterando sus propiedades físicas, químicas y biológicas. La materia orgánica es un indicador clave de la calidad del suelo, el uso de vermicomposta como abono orgánico mejora las características del suelo, es un sustrato que no contamina, contiene sustancias reguladoras de crecimiento, tiene gran capacidad de intercambio catiónico (CIC), alto contenido de ácidos húmicos, mayor capacidad de retención de humedad y proporciona aireación y drenaje al suelo debido a su porosidad (Rodríguez *et al.*, 2007).

*Autor para correspondencia: Elizabeth Urbina Sánchez
Correo electrónico: elizaurbina@yahoo.com

Recibido: 7 de abril 2021

Aceptado: 9 de mayo de 2022

De acuerdo con Bolduc y Hijri (2011) y Leos *et al.* (2022) mencionan, las micorrizas aumentan la resistencia de las plantas a los patógenos, el estrés abiótico, según Azcón y El-Attrash (1997) se aumenta la actividad fisiológica vegetal, se producen hormonas y antibióticos que provocan cambios morfológicos en la planta, a lo que se le atribuye un aumento en el área radical y una mayor eficiencia en la absorción de NO_3^- , PO_4^{2-} , K^+ , Ca^{++} . La simbiosis micorrízica puede mejorar el crecimiento de las plantas y, por lo tanto, reducir la necesidad de fertilizantes a base de fosfato. Según Reyes *et al.* (2021) la aplicación de micorrizas (*Glomus cubense*) aumentó la germinación y el peso fresco en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*). Leos *et al.* (2022) indicaron que los hongos micorrízicos promueven la emergencia de plántula de *Capsicum annum*. Arenas-Julio *et al.* (2021) señalaron, la fertilización nitrogenada incrementa la biomasa total y el rendimiento de los cultivos. El nitrógeno se absorbe principalmente como nitrato (NO_3^-) y, en menor medida, como amonio (NH_4^+) (Antúnez *et al.*, 2014). Marino y Morán (2019) mencionaron que el amonio provoca tolerancia a la salinidad, acidifica la zona de la rizósfera que permite la disponibilidad de nutrientes e incrementa la acumulación de antioxidantes en los cultivos. Antúnez *et al.* (2014), Liu y von Wirén (2017) y Marino y Morán (2019) señalaron que el amonio puede ser tóxico para las plantas al acumularse excesivamente en el citosol de la célula, esto provoca inhibición del crecimiento de raíces y brotes, asociadas con la clorosis de las hojas y desequilibrios iónicos. Según Antúnez *et al.* (2014) las mayores tasas de crecimiento vegetal y de rendimiento de cultivos se obtienen con una relación adecuada de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. Antúnez *et al.* (2014) encontró que con 30 % de NH_4^+ en la solución nutritiva se incrementó la tasa de crecimiento en plantas de crisantemo. Mantovani *et al.* (2018) reporta que con una relación 40% y 50% de NH_4^+ favoreció el crecimiento en plantas de *Phalaenopsis* y *Dendrobium*. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de las concentraciones de amonio en la solución nutritiva, el uso de materia orgánica y micorrizas, así como sus interacciones sobre el crecimiento y calidad de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

La investigación se realizó entre marzo y junio de 2019 bajo un invernadero del Área de Producción del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado a 18° 58' 122" N y 99° 36' 697" O, a una altitud de 2055 m (Enciclopedia de los Municipios de México, 2005). Con un higrómetro se estimaron los promedios de la temperatura (22.2 °C) y la humedad relativa (52.6 %) y la intensidad luminosa promedio de 193 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se midió con un fotómetro durante el ciclo de cultivo.

Material vegetal

El material vegetativo se obtuvo en la Empresa Flores de Bulbos Importados, en el municipio de Villa Guerrero. Se utilizaron bulbos de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset' cal.

14/16, producido en Holanda. Con flores de color rosado, de 3 a 5 botones, un periodo de crecimiento de 90-100 días y una altura de planta de 130-140 cm (<https://www.vws-flowerbulbs.nl/bombilla/2221/indian-summerset>).

Establecimiento del cultivo

La plantación de los bulbos se realizó en 48 cajas de 59.5 cm de largo, 39.5 cm de ancho y una profundidad de 21.5 cm. Se llenaron con 35.5 kg de suelo cernido con malla de 0.5 cm y 4 kg de arena de tezontle, de las 48 cajas a 24 cajas se les adicionó 1.77 kg de vermicomposta y a las otras 24 no se les adicionó. En 12 cajas con vermicomposta y 12 sin vermicomposta se les aplicó micorrizas.

El suelo de textura franco-arenosa y fertilidad baja tenía una concentración de 0.35 % de N total con 508.2, 490.6, 204.6, 730.4, 24.2, 37.4, 347.6 y 426.8 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y Na, respectivamente; pH de 6.1, conductividad eléctrica de 63.2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, materia orgánica de 0.2 % y CIC de 6.34 $\text{meq}\cdot 100\text{g}^{-1}$ [Laboratorio de Suelos Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX, 2020)]. La capacidad de campo del suelo fue 12 % y en la mezcla de suelo+vermicomposta fue de 14 %. Se plantaron seis bulbos por caja, previamente desinfectados en una solución de Benlate (1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), a una profundidad de 8 cm y a una distancia entre planta e hilera de 10 cm; la mitad de los bulbos se inocularon con hongos endomicorrízicos de *Glomus clarum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices*, *E. columbiana* (PHC Hortic Plus®), se emplearon 7 g (50.75 esporas), los cuales se dividieron en dos franjas en el suelo de las cajas y se distribuyeron 3.5 g en el fondo del surco, que se abrió para depositar los bulbos. Se colocó una malla sombra de 50 % desde trasplante hasta corte. Se instalaron varillas de 1.5 m de alto como postes para sostener una malla de nylon para tutoreo con cuadros de 12.5 cm x 12.5 cm, 24 días después del trasplante (DDT).

Riegos

Los riegos del cultivo se llevaron a cabo cada tres días a capacidad de contenedor, con una solución nutritiva de Steiner (Steiner, 1984) a una presión osmótica de 0.24 atm, la cual se modificó con respecto a la relación nitrato:amonio (100:0, 92.5:7.5 y 87.5:12.5 % $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) y se ajustaron a un pH de 5.5 a 6 y una conductividad eléctrica de 0.66 dS m^{-1} y se compararon con la fertilización convencional, en la que se hizo una aplicación con fertilizante granulado 16-16-16 (10 g por caja) un mes después de la plantación, posteriormente se hicieron únicamente dos fertirriegos, el primero mes y medio después de la plantación con fertilizantes solubles 18-46-0 y 19-19-19 (25 g de cada uno en 10 L de agua) y el segundo dos meses y medio después de la plantación con los mismos fertilizantes solubles (25 g de cada uno en 15 L de agua), los riegos normales se hicieron cada tres días solo con agua de riego a capacidad de contenedor. El agua contenía 1.4, 0.15, 1.3, 7.8, 18.2, 0.75, 0.04, 5.7, 153.21, 1.56, y 1 mg L^{-1} de NO_3^- , P, K, Ca, Mg, Br, Mn, Zn, Na, HCO_3^- , Cl y SO_4^{2-} , respectivamente (ICAMEX, 2019).

Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue uno completamente al azar con arreglo factorial, cuyos factores a evaluar fueron: nutrición del cultivo con la solución nutritiva de Steiner a 0.24 atm y tres relaciones de nitrato:amonio ($\text{NO}_3:\text{A}$) 100:0 % (A1), 92.5:7.5 % (A2) y 87.5:12.5 % (A3) respectivamente, y se comparó con la fertilización convencional (Testigo, T). Se evaluó el efecto con micorrizas (CM) y sin micorrizas (SM), y el efecto con vermicomposta (CV) y sin vermicomposta (SV), se conformó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x2x2, en el que los factores fueron amonio, vermicomposta y micorrizas, lo que originó 16 tratamientos con tres repeticiones, cada uno con seis unidades experimentales.

El análisis de las variables se realizó con el paquete estadístico SAS, Statistical Analysis System Versión 9.1 (SAS Institute, 2004), la comparación de medias de los tratamientos se hizo con la prueba de Duncan ($\alpha \leq 0.05$) y la comparación de medias de interacciones con la prueba Sheffé ($\alpha \leq 0.05$).

Variables de calidad y concentración de nutrimentos

La altura total de la planta (HPT), altura al ápice (HPA) y longitud de inflorescencia (LINF) se midieron con flexómetro hecho en México Truper® (cm) de su base al extremo superior. El ancho de botón floral (ABF) se midió en la parte media y su longitud LBF desde la base hasta la punta, en mm, con un vernier digital (Truper®, país). El peso fresco y seco de planta (PFTP, PSTP), tallo (PFT, PST), inflorescencia (PFINF, PSINF) de hoja (PFH, PSH) y bulbo (PFB, PSB) se midieron con una báscula digital con una precisión de 0.01 g (Ohaus®, EUA), las muestras se colocaron en bolsas de papel introduciéndolas en una estufa de aire forzado a 72° C hasta obtener un peso constante.

Contenido de macronutrimentos N, P, K, Ca y Mg se determinó en las hojas de los tallos florales. El nitrógeno total se determinó mediante una digestión ácida por el método Kjeldahl en su versión micro (< 100 mg). El resto de los macronutrimentos se extrajeron mediante una digestión húmeda, con una mezcla en una proporción 2:1 de H_2SO_4 y HClO_4 (CSTPA, 1980) y su cuantificación se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica Varian® (Palo Alto, California, EUA) para el caso de K, Ca, y Mg, mientras que la concentración de P se hizo por el método colorimétrico con un espectrofotómetro Hach DR 2800® (Ames, Iowa, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el factor fertilización (Tabla 1) no se detectaron diferencias significativas en las variables contenido de calcio en hoja, en contraste con fósforo que presentó diferencia altamente significativa, mientras que el contenido de potasio y magnesio presentaron diferencia significativa por efecto de la solución nutritiva y la fertilización convencional o testigo.

El nitrógeno y calcio, éstos se mantienen dentro del rango de suficiencia que va de 2.00 a 4.00 % en nitrógeno y de 0.20 a 2.20 % para calcio (Tabla 1; Mills y Benton, 1996). El fósforo y potasio son altos de acuerdo a los rangos de

suficiencia registrados (Tabla 1). Mills y Benton (1996) indican que los niveles de suficiencia están entre 0.19 a 0.31 % en fósforo y entre 1.49 a 3.91 % en potasio. El contenido de magnesio es bajo, entre 0.19 a 0.30 % (Mills y Benton, 1996). Las soluciones utilizadas en la investigación contribuyen a una buena nutrición de macronutrimentos ya que no se presentaron deficiencias o anomalías en el cultivo y tampoco toxicidad con los rangos de valores presentados, a excepción del magnesio (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del amonio, vermicomposta y micorrizas sobre el contenido de macronutrimentos en hoja de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' cultivada en suelo.

Table 1. Effect of ammonium, vermicompost and mycorrhiza on macronutrients content in *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' grown in soil.

FACTOR	Concentración				
	N --- % ---	P --- % ---	K --- % ---	Ca --- % ---	Mg --- % ---
Amonio					
0%	2.10 a	0.61 a**	4.79 b*	1.31 a	0.16 a*
7.5%	2.03 a	0.55 a	4.81 b	1.37 a	0.16 a
12.5%	2.55 a	0.27 b	5.13 a	1.26 a	0.13 b
Testigo	2.35 a	0.29 b	5.13 a	1.35 a	0.13 b
Vermicomposta					
(sin)	2.01 b*	0.42 a	4.40 b**	1.31 a	0.15 a
(con)	2.50 a	0.44 a	5.53 a	1.33 a	0.14 a
Micorrizas					
(sin)	2.38 a	0.44 a	5.01 a	1.33 a	0.15 a
(con)	2.13 a	0.43 a	4.92 a	1.31 a	0.14 a
Interacción					
A*V	NS	NS	NS	NS	NS
A*M	NS	NS	NS	NS	NS
V*M	NS	NS	NS	NS	NS
A*V*M	NS	NS	NS	NS	NS
C.V.	13.26	20.36	6.84	19.85	17.88

* Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, (Duncan; $P \leq 0.05$). N = nitrógeno, P = fósforo, K = potasio, Ca = calcio, Mg = magnesio.

† Different letters in the same column indicate significant differences (Duncan; $P \leq 0.05$). N = nitrogen, P = phosphorus, K = potassium, Ca = calcium, Mg = magnesium.

El alto contenido de fósforo en hojas registrado en los factores evaluados y principalmente en la solución a la cual no se le suministró amonio (A1) y 7.5 % de amonio (A2) puede deberse a que la aplicación de amonio en la solución nutritiva acidifica la rizósfera (Marschner, 1995). Al aumentar la acidez del suelo se incrementa la actividad del hierro y del aluminio, en esta forma los fosfatos solubles quedan fijados como compuestos complejos e insolubles de hierro y aluminio (Sanguino, 1961), por lo tanto, se disminuye la cantidad de fósforo disponible para las plantas con alto nivel de amonio. Caso contrario ocurre en un sistema hidropónico que reportó Parra *et al.* (2012), en donde al aplicar una mayor concentración de amonio (15 %) con la solución nutritiva de

Steiner hubo una mayor absorción de fósforo en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

La solución A3 es la más equilibrada ya que los valores de contenido de macronutrientes en hoja presentados en la investigación, se mantienen en los rangos de suficiencia que reportan Mills y Benton (1996), solo magnesio quedó con una diferencia de 0.06 por debajo de los niveles de suficiencia y potasio con una diferencia de 1.22 % por arriba de los niveles, debido a esto se recomienda disminuir los niveles de potasio y aumentar los de magnesio para ajustar la solución nutritiva en relación a los rangos de suficiencia para el cultivo de *Lilium hybrida*. A pesar de que los valores de concentración de potasio superaron los niveles de suficiencia, no se presentaron daños por toxicidad y se obtuvieron plantas de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset' con una altura de hasta 91 cm, siendo esta considerada un parámetro de calidad. Por su parte Xu *et al.* (2002) concluyeron que el NH_4^+ en una concentración de 15 al 30 % del N total en la solución nutritiva aumenta el rendimiento de pimiento dulce (*Capsicum annuum* L. cv. Hazera 1195), así como la eficiencia del uso de K.

Szczerba *et al.* (2006) explican que la absorción de potasio en las plantas se da por dos sistemas de transporte de membrana distintos: el sistema de transporte de alta afinidad funciona a concentraciones externas bajas (<1 mM) de K^+ y el flujo se da hacia dentro de la célula en contra de un gradiente electroquímico, mediante el uso de un mecanismo de transporte paralelo K^+/H^+ , y en el sistema de transporte de baja afinidad dominan concentraciones externas más altas (>1 mM) de K^+ , a través de la actividad de los canales de potasio. Los resultados expuestos (Tabla 1) sobre el contenido alto de potasio en hojas de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset' podrían ser explicados por lo dicho anteriormente, ya que el transporte de K^+ a una alta concentración en la parte externa de la célula, es limitante del transporte de NH_4^+ y contribuye a disminuir su toxicidad a niveles altos de K^+ . Probablemente los resultados se deben a la concentración de potasio en la solución nutritiva utilizada (2.33 mM) que rebasa lo expuesto por Szczerba *et al.* (2006), en este caso el amonio está siendo absorbido a través de canales que limitan la absorción de amonio y por la tanto su toxicidad. La similitud del K^+ con el NH_4^+ , en cuanto a su valencia y diámetro del ion hidratado, puede estar impidiendo la absorción de amonio debido a la alta concentración de potasio.

Marschner (1995) y Parra *et al.* (2012) encontraron que al aumentar el suministro de amonio en 15 % en la solución nutritiva de Steiner se disminuyó la concentración de magnesio a 0.2 % en tallos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), resultados similares se encontraron en las hojas de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset', al utilizar una solución con 12.5 % de amonio (Tabla 1).

Britto y Kronzucker *et al.* (2002) mencionaron que uno de los efectos dañinos que puede ocasionar el suministro de niveles altos de NH_4^+ en la planta es la inhibición de la absorción de cationes como el magnesio. Marschner (1995) citó que la absorción del magnesio puede estar fuertemente abatida por cationes como el amonio. Urbina *et al.* (2020)

reportaron que la concentración de Mg en la hoja de chile huacle (*Capsicum annuum* L.) disminuyó por efecto del NH_4^+ .

Con respecto al factor aporte de vermicomposta en el suelo, se observa que no existieron diferencias significativas para las variables contenido de fósforo, calcio y magnesio en hoja, sin embargo, la aplicación de vermicomposta tuvo efecto altamente significativo sobre el contenido de potasio y efecto significativo en nitrógeno. Velasco *et al.* (2001) tuvieron resultados similares en cuanto a la adición de vermicomposta en plantas de tomate de cáscara (*Physalis spp.*) var. Rendidora con relación al contenido de nitrógeno con 2 %. De acuerdo con los rangos de suficiencia de macronutrientes reportados por Mills y Benton (1996) en *Lilium hybrida*, se destaca que los valores registrados sobre la variable contenido de potasio variaron de 4.40 a 5.53 (Tabla 1), los cuales son altos ya que exceden el rango de suficiencia que es de 1.49-3.91, en cuanto al nitrógeno los valores obtenidos variaron de 2.01 a 2.50 mismos que se mantienen dentro de la suficiencia de 2-4, de esto se asume que la vermicomposta aplicada al 5 % en el cultivo de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' provee el contenido de nitrógeno suficiente para un buen crecimiento de la planta. El contenido de magnesio es bajo mientras que la concentración de fósforo es alta, y los niveles de calcio se mantuvieron dentro del rango suficiencia de 0.20-2.20, en hojas de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset', conforme a los niveles de suficiencia reportados por Mills y Benton (1996). Cabe señalar que, en todos los factores estudiados, fertilización, vermicomposta y micorrizas, los niveles de concentración de nutrientes mantienen la misma tendencia.

Cuando se fertilizó el cultivo de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset' con vermicomposta se elevó la concentración de nitrógeno y potasio en hojas, con respecto a las plantas que no se les aportó materia orgánica. No así en el contenido de fósforo donde no existieron diferencias significativas por efecto del uso de vermicomposta (Tabla 1), resultados similares fueron mostrados por Manjarrez *et al.* (1999) quienes tampoco obtuvieron diferencias por el contenido de fósforo en hoja de chile serrano (*Capsicum annuum* L.).

En el factor aplicación de micorrizas (Tabla 1) se destaca que no se obtuvo diferencias significativas sobre el contenido macronutrientes evaluados en hojas de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset'. La aplicación de micorrizas no afectó la absorción de N, P, K, Ca y Mg; contrario a lo reportado por Azcón y El-Atrash (1997) quienes indicaron que las micorrizas mejoran la producción de hormonas y antibióticos que contribuyen al aumento del área de la raíz y por lo tanto a una mayor eficiencia en la absorción de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio. Bolduc y Hijri (2011) señalaron que el micelio producido por las micorrizas genera una extensa red de hifas que permite mayor absorción de nutrientes. Por su parte Sylvia *et al.* (1993) dicen que las micorrizas modifican el pH de la rizósfera mejorando con ello la absorción nutrimental. En cuanto al fósforo quizá no hubo efecto en la absorción de este elemento en *Lilium hybrida* 'Indian Summerset' debido al alto suministro de fósforo en la solución, Sylvia *et al.* (1993) advierte que cuando existen alrededor de 10 mg/Kg⁻¹ de P ex-

traíble en el suelo se afectan la funcionalidad de los hongos y sus beneficios.

El factor fertilización afectó la variable altura de planta al ápice, la mayor diferencia se presenta entre la solución con 12.5 % amonio y la solución con 0 % amonio con 3.37 cm (Tabla 2). Se enfatiza que la mayor altura de planta al ápice se obtiene cuando se usa 12.5 % de amonio en la solución evaluada. Álvarez *et al.* (2008) al suministrar una solución nutritiva de 0.72 atm a plantas de *Lilium* cv. Vermeer cultivadas en hidroponia, reportaron que la altura del tallo fue de 94.3 cm, mientras que en esta investigación se obtuvo una altura de tallo de 91.15 cm con la solución nutritiva a 12.5 % de amonio aplicada en suelo. Una relación adecuada de NO_3^- y NH_4^+ en una solución nutritiva incrementa el crecimiento en relación con la altura de planta, biomasa y el rendimiento de los cultivos (Chang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

Tabla 2. Efecto del amonio, vermicomposta y micorrizas sobre la altura de tallo y longitud de flor de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' cultivada en suelo.

Table 2. Effect of ammonium, vermicompost and mycorrhiza on stem height and flower length of *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' grown in soil.

FACTOR	Variables de calidad de <i>Lilium</i>				
	HPT --- cm ---	HPA --- cm ---	LINF --- cm ---	ABF --- mm ---	LBF --- mm ---
Amonio					
0%	88.13 a	71.45 b	16.69 a	23.56 a	80.41 a
7.5%	88.79 a	72.32 a	16.48 a	22.92 a	78.18 a
12.5%	91.15 a	74.82 a	16.37 a	22.54 a	80.63 a
Testigo	88.72 a	71.73 b	17.01 a	23.18 a	81.39 a
Vermicomposta					
(sin)	97.33 a**	78.68 a**	18.67 a**	25.14 a**	85.98 a**
(con)	81.07 b	66.48 b	14.60 b	20.96 b	74.32 b
Micorrizas					
(sin)	90.43 a†	73.65 a†	16.81 a	23.23 a	80.96 a
(con)	87.96 b	71.51 b	16.47 a	22.87 a	79.34 a
Interacción					
A*V	NS	NS	NS	NS	NS
A*M	*	*	NS	NS	NS
V*M	NS	NS	NS	NS	NS
A*V*M	NS	NS	NS	NS	NS
C.V.	4.28	4.35	10.27	5.84	7.64

† Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, (Duncan; $P \leq 0.05$). HPT = altura de planta total, HPA altura de planta al ápice, LINF = largo de inflorescencia, ABF = ancho de botón floral, LBF = largo de botón floral.

† Different letters in the same column indicate significant differences, (Duncan; $P \leq 0.05$). HPT = total plant height, HPA plant height at apex, LINF = inflorescence length, ABF = flower bud width, LBF = flower bud length.

Con relación a la aplicación de vermicomposta, Domínguez *et al.* (2010) refirieron que ésta puede aumentar el crecimiento y desarrollo vegetal debido a que mejora las

propiedades físicas y químicas de los suelos, aporta microorganismos benéficos que incrementan la disponibilidad de nutrimentos, aumenta la actividad enzimática y la producción de fitohormonas. Como se sabe, el humus de lombriz tiene efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo en diversas especies vegetales, contrario a lo ocurrido en esta investigación; cuando se aplicó materia orgánica al cultivo de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' se registró un menor crecimiento (Tabla 2). A pesar de que las plantas tratadas con vermicomposta mostraron una mayor concentración de nitrógeno y potasio en hojas (Tabla 1), éstas no presentaron un incremento en el crecimiento. En las plantas donde no se utilizó vermicomposta se tuvo mayor altura de planta total con una diferencia de 16.29 cm, la altura de planta al ápice tuvo una diferencia de 12.2 cm, la longitud de la inflorescencia tuvo una diferencia de 4.07 cm, mientras que la variable ancho de botón floral mostró una diferencia de 4.18 mm, y la longitud de botón floral tuvo una diferencia de 13.66 mm (Tabla 2). Dichos resultados pudieron deberse a lo citado por Zaller (2007) quien menciona que la respuesta de las plantas a la vermicomposta es variable, de acuerdo a la especie vegetal y la variedad en la que se suministre. Por su parte Rodda *et al.* (2006) y Roberts *et al.* (2007) señalaron que el efecto de la vermicomposta sobre las plantas también va a depender del proceso de producción de ésta, el material de origen y el tiempo de almacenamiento.

Atiyeh *et al.* (2000) concluyeron que la respuesta de las plantas de tomate a la vermicomposta va a depender de su concentración en el medio de cultivo, ellos probaron diferentes concentraciones de vermicomposta para la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cuando utilizaron 100 % de vermicomposta el rendimiento del cultivo disminuyó mientras que cuando utilizaron proporciones de 10 % y hasta 40 % mejoró el rendimiento. Los mismos autores señalaron que el suministro de vermicomposta en las plantas dan una respuesta típica hormonal, a menor concentración existe un mayor crecimiento de la planta y a mayor concentración se presenta una disminución del mismo. Por su parte Roberts *et al.* (2007) encontraron que el rendimiento, número y peso de frutos no se vieron afectados por la presencia de vermicomposta; con sus resultados rebatieron que los beneficios reportados por la vermicomposta en la producción hortícola son exagerados. Bachman y Metzger (2008) reportaron que la incorporación de vermicomposta en el sustrato a una concentración de 20 % mejoró el peso de brotes y raíces, área foliar y proporciones brote: raíz de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y caléndula francesa (*Tagetes patula nana*), sin embargo, la vermicomposta tuvo poca influencia sobre el crecimiento de plántulas de pimienta.

Las plantas de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset' a las que no se les inoculó con micorrizas tuvieron un incremento en la altura de planta total (2.47 cm) y altura de planta al ápice (2.14 cm), más que las plantas que si fueron inoculadas. Azcón y El-Atrash (1997) mencionaron que las micorrizas producen hormonas y antibióticos que promueven el crecimiento de la raíz, lo que provoca una mayor eficiencia en la absorción de

nutrimentos y por lo tanto mejora el crecimiento de las plantas, caso contrario ocurrió en esta investigación, en donde no hubo respuesta de las plantas de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' a la inoculación de micorrizas y sus beneficios, esto alude a que la planta absorbió fósforo directamente de la solución nutritiva, a pesar de que ésta tiene una concentración de 0.24 atm, su contenido de fósforo puede ser alto para el caso de *Lilium*, esto sugiere que los niveles de fósforo en la solución nutritiva se pueden reducir aún más, con el propósito de promover los beneficios de la micorriza; Smith *et al.* (2011) propuso que la aplicación excesiva de fósforo puede alterar la colonización de las micorrizas en las raíces y en el suelo. Sylvia *et al.* (1993) mencionaron que concentraciones de 10 mg·Kg⁻¹ de P extraíble en el suelo afectan la funcionalidad de los hongos y los beneficios que aportan a las plantas. En general Rubí *et al.* (2009) dijo que la aplicación excesiva de fertilizantes puede evitar el crecimiento de las micorrizas.

En la Figura 1 se observa el efecto interactivo de los factores amonio x micorrizas sobre la variable altura de planta al ápice, se destaca que con el suministro de 0 % y 12.5 % de amonio en la solución nutritiva y sin aplicación de micorrizas se tiene la mayor altura de planta al ápice. También se distingue que no hubo diferencias significativas respecto a las plantas que son regadas con 7.5 % y 12.5 % de amonio y con la inoculación de micorrizas. En estos resultados se observa que en la mayoría de los tratamientos el suministro de amonio incrementó la altura del tallo al ápice en *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'. En la misma figura se destaca que con 7.5 % de amonio y sin micorrizas y el Testigo no mejoraron la longitud de tallo al ápice. Las plantas sin amonio y con la inoculación de micorrizas tuvieron la menor longitud de tallo al ápice. El testigo con y sin micorrizas no mejora la calidad de los tallos de corte de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset'.

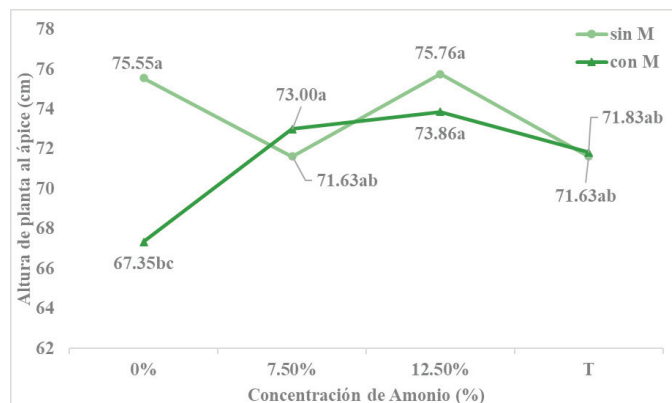


Figura 1. Efecto de la interacción amonio x micorrizas sobre la variable altura de planta al ápice (cm) en el cultivo de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'.

Figure 1. Effect of the ammonium x mycorrhiza interaction on the variable height of the plant at the apex (cm) in the cultivation of *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'.

En la Figura 2 se observa el efecto interactivo de los factores amonio x micorrizas sobre la variable altura de planta total, se destaca que con el suministro con 0 % y 12.5 % de amonio y sin micorrizas se incrementó la longitud del tallo en *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' lo que sugiere que con el sólo suministro de la solución nutritiva se tienen tallos de calidad. Las plantas en las que no se adicionó amonio y se aplicó micorrizas la altura de los tallos no incrementó.

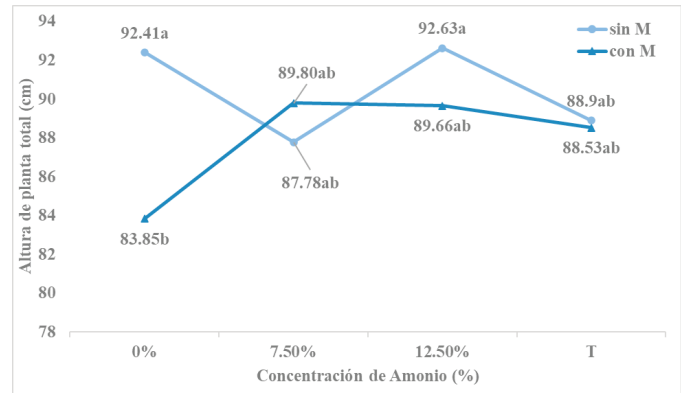


Figura 2. Efecto de la interacción amonio x micorrizas sobre la variable altura de planta total (cm) en el cultivo de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'.

Figure 2. Effect of the ammonium x mycorrhiza interaction on the variable total plant height (cm) in the cultivation of *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'.

El tipo de fertilización utilizado en la investigación tuvo un efecto altamente significativo para las variables peso seco de toda la planta y peso seco del tallo, mientras que el peso seco de la inflorescencia y de la hoja muestran diferencia significativa. En general se distingue que el peso seco se ve afectado por el tipo de fertilización, y particularmente las aplicaciones de solución nutritiva con amonio (12.5 %) sobresalen con respecto a la solución sin amonio. La diferencia que se presenta en la variable peso seco de toda la planta entre la solución sin amonio y la solución con 12.5 % de amonio fue de 2.47 g, lo que representa el 20.79 % mayor. Álvarez *et al.* (2008) obtuvieron resultados similares en *Lilium cv. Vermeer* a los expuestos en el Tabla 3 con relación a la variable peso seco de toda la planta, con 15.9 g planta⁻¹ al aplicar una solución nutritiva de Steiner de 0.72 atm en hidroponía.

La variable peso seco de tallo presenta una diferencia de 0.8 g entre la solución con 12.5 % de amonio y la solución sin amonio, lo que representa 18.05 % más. La variable peso seco de inflorescencia presenta una diferencia de 0.84 g entre la solución A3 y la solución A1, lo que representa 28.96 % mayor. En cuanto a la variable peso seco de hoja se obtuvo una diferencia de 1.97 g entre la solución A3 y la solución A1, lo que representó el 43.68 % superior. Esto se pudo deber a que la asimilación del amonio es más eficiente energéticamente hablando que la asimilación del nitrato. Antúnez *et al.* (2014) citaron que una adecuada combinación de amonio y nitrato incrementa la absorción de nitrógeno en las plantas, es incorporado rápidamente a esqueletos carbonados para

Tabla 3. Efecto del amonio, vermicomposta y micorrizas sobre peso fresco y seco de bulbo, tallo, hoja y flor de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' cultivada en suelo.**Table 3.** Effect of ammonium, vermicompost and mycorrhiza on fresh and dry weight of bulb, stem, leaf and flower of *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' grown in soil.

FACTOR	Variables de calidad de <i>Lilium</i>								
	PFB	PFTP	PFINF	PFT	PSB	PSTP	PSINF	PST	PSH
	g								
Amonio									
0%	54.09 a	121.67 a	42.13 a	37.99 a	13.51 a	11.88 c**	2.90 b*	4.43 b**	4.51 b
7.5%	54.38 a	125.13 a	37.36 a	39.56 a	14.60 a	14.08 b	3.67 a	5.11 a	5.28 b
12.5%	55.08 a	125.96 a	35.68 a	39.86 a	12.91 a	14.35 a	3.74 a	5.23 a	6.48 a
Testigo	61.16 a	125.24 a	45.84 a	37.43 a	16.08 a	13.12 b	3.69 a	4.62 b	5.02 b
Vermi.									
(sin)	59.99 a*	135.45 a**	46.71 a*	42.47 a**	15.56 a*	14.82 a**	3.93 a**	5.61 a**	5.23 a
(con)	52.36 b	113.55 b	33.79 b	34.95 b	12.99 b	11.89 b	3.07 b	4.08 b	5.41 a
Mico.									
(sin)	56.06 a	123.77 a	39.62 a	38.30 a	13.86 a	13.41 a	3.55 a	4.89 a	5.63 a
(con)	56.29 a	125.23 a	40.88 a	39.12 a	14.69 a	13.30 a	3.45 a	4.80 a	5.02 a
Inter.									
A*V	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
A*M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
V*M	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
A*V*M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C.V.	22.8	9.88	7.64	9.74	28.88	9.18	17.13	8.34	9.98

† Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, (Duncan; $P \leq 0.05$). PFB = peso fresco de bulbo, PFTP = peso fresco total de planta, PFINF = peso fresco de inflorescencia, PFT = peso fresco de tallo, PSB = peso seco de bulbo, PSTP = peso seco total de planta, PSINF = peso seco de inflorescencia, PST = peso seco de tallo, PSH = peso seco de hoja.

† Different letters in the same column indicate significant differences, (Duncan; $P \leq 0.05$). PFB = fresh bulb weight, PFTP = total fresh plant weight, PFINF = fresh inflorescence weight, PFT = fresh stem weight, PSB = bulb dry weight, PSTP = total plant dry weight, PSINF = inflorescence dry weight, PST = stem dry weight, PSH = leaf dry weight.

formar aminoácidos y por lo tanto aumenta el crecimiento de los cultivos. Urbina *et al.* (2020) encontraron que la respuesta en el rendimiento de las plantas al suministro de amonio en dos poblaciones de chile huacle (*Capsicum annuum* L.) fue diferente en cada una dependiendo de la concentración de amonio suministrada. Con esto se infiere que el suministro de amonio en una concentración adecuada para cada cultivo, especie, variedad o población tiene una respuesta satisfactoria en el crecimiento de las plantas. Este incremento en la biomasa (peso seco) en las variables reportadas en el Tabla 3 se puede explicar debido a que el nitrógeno es un componente de las proteínas (Pajares, 2016). Maldonado (2008) indica que las plantas incorporan el amonio en esqueletos carbonados

para la síntesis de aminoácidos, evitan su acumulación por la toxicidad y lo incorporan rápidamente para formar proteínas e incrementar la biomasa de las plantas.

Cuando no se suministró vermicomposta al cultivo de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' se tuvieron diferencias altamente significativas en las variables peso fresco total de planta, peso fresco de tallo, peso seco total de planta, peso seco de inflorescencia y peso seco de tallo, y diferencias significativas en las variables peso fresco de bulbo, peso fresco de inflorescencia y peso seco de bulbo; pero no hubo diferencias para la variable peso seco de hoja. Se destaca que las plantas no respondieron al suministro de vermicomposta con relación a las variables de crecimiento (Tabla 3). Estos

resultados son similares a los alcanzados por Rodríguez et al. (2007) quienes trataron plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con arena más fertilizantes, y las compararon con plantas tratadas con una mezcla de arena más vermicomposta y micronutrientes quelatizados, y también plantas con arena más extracto de vermicomposta, sus resultados con relación a la biomasa demuestran que el tratamiento químico superó en 20 % en cuanto a producción, con respecto a las plantas a las que les aplicaron vermicomposta. Manjarrez et al. (1999) no encontró efectos significativos de las dosis aplicadas de vermicomposta en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.). De acuerdo con los reportes de Hartz et al. (1996), Manjarrez et al. (1999), Velasco et al. (2001) y Rodríguez et al. (2007) se infiere que puede no haber un efecto por el uso de vermicomposta con relación a la variable biomasa. Al contrario, Ozores et al. (1994) señalaron que el uso de composta aumentó la biomasa del cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rodríguez et al. (2007) también encontraron que el peso seco de las plantas de jitomate que ellos produjeron en una mezcla de arena más vermicomposta y micronutrientes quelatizados igualaron a las fertilizadas de forma convencional (arena más fertilizante químico) pero no las superaron. Velasco et al. (2001) mencionaron que las plantas de tomate de cáscara var. Rendidora responden positivamente a la adición de vermicomposta con relación a la acumulación de materia seca total, a los 60 y 90 DDS.

En general no se muestran efectos de la aplicación de las micorrizas sobre la biomasa de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset' (Tabla 3), esto se puede deber al efecto de la concentración de la solución nutritiva utilizada o a la baja cantidad de inóculo de micorrizas (7 g), en cambio Rubí et al. (2009) encontraron diferencias significativas para las variables peso seco de raíz, peso seco de tallo y peso seco de flor en *Lilium sp.* cv Orange pixie, al utilizar 100 g de inóculo de *Glomus fasciculatum* por 1 kg de suelo. Manjarrez et al. (1999) también consiguió efecto positivo sobre la biomasa de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) a una dosis de 15 g de inóculo de micorrizas en macetas con 5 kg de suelo. En cuanto a la influencia de la solución nutritiva a pesar de tener una concentración de 0.24 atm, quizá esta pudo inhibir el efecto de las micorrizas sobre el incremento de la biomasa de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset', con relación a esto, Rubí et al. (2009) señala que el uso excesivo de fertilizantes puede ser nocivo para los hongos micorrízicos. Dichos autores concluyeron que el período de inoculación, el tipo de aislado del hongo, la fuente y concentración del fertilizante químico se deben considerar para maximizar los beneficios de la simbiosis y en este trabajo dichos factores también pudieron influir sobre la respuesta *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset' al uso de micorrizas. Manjarrez et al. (1999) dice que el uso de vermicomposta no afecta la colonización micorrízica.

En el Tabla 3 se observa que existió un efecto interactivo entre el uso de vermicomposta y micorrizas (Figura 3). La interacción sin vermicomposta y con micorrizas incrementó el peso fresco de toda la planta, lo mismo ocurre con la interacción sin vermicomposta y sin micorrizas. Cuando se

aplica vermicomposta y se inoculan las plantas con micorrizas se disminuye el peso fresco de la planta, de igual forma ocurre cuando únicamente se aplica vermicomposta. Estos resultados se contraponen con los expuestos por Manjarrez et al. (1999), quienes al inocular con hongos micorrízicos y aplicar 3 g de vermicomposta mejoraron el peso fresco de fruto y seco de follaje de chile serrano (*Capsicum annuum* L.). Velasco et al. (2001) reportaron que la combinación de vermicomposta más micorrizas (*Glomus intraradix*) incrementó el peso seco en tomate de cáscara (*Physalis spp.*) Rendidora, superando a los tratamientos con solo vermicomposta.

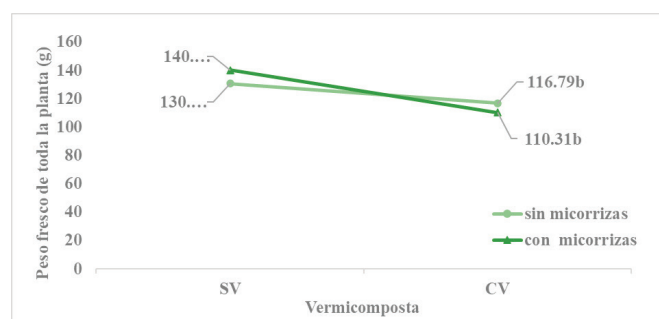


Figura 3. Efecto de la interacción vermicomposta x micorrizas sobre la variable peso fresco de toda la planta (g) en el cultivo de *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'.

Figure 3. Effect of the vermicompost x mycorrhiza interaction on the whole plant variable fresh weight (g) in the cultivation of *Lilium hybrida* var. 'Indian Summerset'.

CONCLUSIONES

Un suministro alto de amonio (12.5 %) en la solución nutritiva mejora la calidad de los tallos florales de *Lilium hybrida*. 'Indian Summerset', incrementa la absorción de potasio, pero disminuye la absorción de magnesio. Concentraciones bajas de amonio mejoran la absorción de fósforo y magnesio. En general la vermicomposta ni las micorrizas influyeron positivamente sobre el crecimiento de *Lilium hybrida* 'Indian Summerset'. Con la aplicación de vermicomposta al suelo se incrementa la concentración de nitrógeno y potasio en hoja de *Lilium*, en cambio con el uso de micorrizas no hubo efecto en la concentración de macronutrientes en hoja.

REFERENCIAS

- Álvarez, S. M. E., Maldonado, T. R., García, M. R., Almaguer, V. G., Rupit, A. J. y Zavala, E. F. 2008. Suministro de calcio en el desarrollo y nutrición de *Lilium* asiático. *Agrociencia*. 42: 881-889.
- Antúnez, O. O. M., Sandoval, V. M., Alcántar, G. G. y Solís, M. M. 2014. Aplicación de amonio y nitrato en plantas de *Physalis peruviana* L. *Agrociencia*. 48: 805-817.
- Arenas-Julio, Y. R., Escalante-Estrada, J. A. S., Aguilar, C. C., Rodríguez, G. M. T. y Sosa, M. E. 2021. Rentabilidad y rendimiento de girasol en función del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante. *Biotecnia*. 23: 45-51.
- Atiyeh, R. M., Arancon, N., Edwards, C. A. and Metzger, J. D. 2000. Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. *Bioresource Technology*. 75: 75-180.

- Azcón, R. and El-Atrash, F. 1997. Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N₂ fixation (¹⁵N) in *Medicago sativa* at four salinity levels. *Biology and Fertility of Soils*. 24: 81-86.
- Bachman, G. R. and Metzger, J. D. 2008. Growth of bedding plants in commercial potting substrate amended with vermicompost. *Bioresource Technology*. 99: 3155-3161.
- Bolduc, A. and Hijri, M. 2011. The Use of mycorrhizae to enhance phosphorus uptake: A way out the phosphorus crisis. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides*. 2: 1000104.
- Britto, D. T. and Kronzucker, H. J. 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*. 159: 567-584.
- Chang, J., Liu, D., Cao, H., Chang, S. X., Wang, X., Huang, C. and Ge, Y. 2010. NO₃⁻/NH₄⁺ ratios affect the growth and N removal ability of *Acorus calamus* and *Iris pseudacorus* in a hydroponic system. *Aquatic Botany*. 93: 216-220.
- Chen, B., Liu, D., Han, W., Fan, X., Cao, H., Jiang, Q. and Ge, Y. 2015. Nitrogen-removal ability and niche of *Coix lacryma-jobi* and *Reineckia carnea* in response to NO₃⁻/NH₄⁺ ratio. *Aquatic Botany*. 120: 193-200.
- 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*. 26: 259-371.
- Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, Estado de México. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Secretaría de Gobernación. [Consultado 13 octubre 2020] 2010. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/>
- Hartz, T. K., Costa, F. J. and Schrader, W. L. 1996. Suitability of composted green waste for horticultural uses. *Hortscience* 31: 961-964.
- Leos, E. L., García, C. M., Delgadillo, M. J., Valenzuela, G. A. A. Angulo, C. A., Preciado, R. P. y Rueda, P. E. O. 2022. Consorcios de hongos micorrízicos y rizobacterias en el control biológico de *Phytophthora capsici* en cultivares de *Capsicum annum*. *Biocencia*. 24: 30-37.
- Liu, G. Du. Q. and Li, J. 2017. Interactive effects of nitrate-ammonium ratios and temperatures on growth, photosynthesis, and nitrogen metabolism of tomato seedlings. *Scientia Horticulturae* 214: 41-50.
- Liu, Y. and von Wirén, N. 2017. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany*. 68: 2581-2592.
- Maldonado, J. M. 2008. Asimilación del nitrógeno y del azufre. En: *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2 ed, Azcon B., J. y Talón, M. (ed.), pp 287-303. McGraw Hill-Interamericana de España. S.A.U.
- Manjarrez, M. M. J., Ferrera, C. R. y González, C. M. C. 1999. Efecto de la vermicomposta y la micorriza arbuscular en el desarrollo y tasa fotosintética de chile serrano. *Terra Latinoamericana*. 17: 9-15.
- Mantovani, C., Prado, R. M. and Pivetta, K. F. L. 2018. Impact of Nitrate and Ammonium ratio on Nutrition and Growth of two Epiphytic Orchids. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 90: 3423-3431.
- Marino, B. D. and Morán, J. J. F. 2019. Can ammonium stress be positive for plant performance?. *Frontiers in Plant Science*. 10: 01103.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Edition, Academic Press. San Diego, C.A., USA. 651 p.
- Mills, A. H. and Benton, J. Jr. 1996. *Plant Analysis Handbook II*. MicroMacro Publishing Athens, GA, USA.
- Ozores, H. M., Schaffer, B. and Bryan, H. H. 1994. Nutrient concentrations, growth, and yield of tomato and squash in municipal solid-waste-amended soil. *Hortscience* 29: 785-788.
- Pajares, M. S. 2016. La cascada del nitrógeno ocasionada por actividades humanas. *Oikos*. Instituto de Ecología de la UNAM.
- Parra, T. S., Mendoza, P. G. y Villarreal, R. M. 2012. Relación nitrato/amonio/urea y concentración de potasio en la producción de tomate hidropónico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 113-124.
- Portal VWS export-import of flowerbulbs BV. [Consultado 13 junio 2020] 2020. Disponible en: <https://www.vws-flowerbulbs.nl/bombilla/2221/indian-summerset>.
- Reyes, P. J. J., Rivero, H. M., Andagoya, F. C. J., Beltrán, M. F. A., Hernández, M. L. G., García, L. A. E. and Ruiz, E. F. H. 2021. Emergencia y características agronómicas del *Cucumis sativus* a la aplicación de quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos. *Biocencia*. 23: 38-44.
- Roberts, P., Jones, D. L. and Edwards, J. G. 2007. Yield and vitamin C content of tomatoes grown in vermicomposted wastes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 1957-1963.
- Rodda, M. R. C., Canellas, L. P., Façanha, A. R., Zandonadi, D. B., Guerra, J. G. M., Almeida, D. L. and Santos, G. A. 2006. Estimulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto: I - efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 30: 649-656.
- Rodríguez, D. N., Cano, R. P., Favela, C. E., Figueroa, V. U., Paul, Á. V., de Palomo, G. A., Márquez, H. C. y Moreno, R. A. 2007. Vermicomposta como alternativa orgánica en la producción de tomate en invernadero. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 13: 185-192.
- Rubí, A. M.; Olalde, P. V., Reyes, R., Bernardo, G., González, H. A. y Aguilera, G. L. I. 2009. Influencia de *Glomus fasciculatum* en el crecimiento y desarrollo de *Lilium sp.* cv Orange Pixie. *Agricultura Técnica en México*. 35: 201-210.
- Sanguino, S. L. E. 1961. Influencia del pH sobre la fijación de fósforo y su relación con la respuesta del maíz a la fertilización fosfatada. *Acta Agronómica*. 11: 3-4.
- Statistical Analysis Software, SAS. 2004. *SAS/STAT User's Guide* 9.1. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, USA. 5136 p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. 2022. [consultado enero de 2022] 2022. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php.
- Smith, S. E., Jakobsen, I., Grønlund, M. and Smith, A. F. 2011. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology*. 156: 1050-1057.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *in: Proceeding of the 6th International Congress on Soilless Culture*. International Society for Soilless Culture. Wageningen, The Netherlands. pp 633-649.

- Sylvia, D. M., Wilson, D. O., Graham, J. H., Maddox, J. J., Miliner, P., Morton, J. B., Skipper, H. D., Widght S. F and Jarstfer, A. G. 1993. Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in diverse plants and soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 25 6 705-713.
- Szczerba, M. W., Britto, D. T. and Kronzucker, H. J. 2006. Rapid, futile K⁺ cycling and pool-size dynamics define low-affinity potassium transport in barley. *Plant Physiology*. 141: 494-1507.
- Urbina, S. E., Cuevas, J. A., Reyes, A. J. C., Alejo, S. G., Valdez, A. L. A. y Vázquez, G. L. M. 2020. Solución nutritiva adicionada con NH₄⁺ para producción hidropónica de chile huacle (*Capsicum annum* L.). *Revista. Fitotecnia. Mexicana*. 43: 291-298.
- Velasco, V. J., Ferrera, C. R. y Almaraz, S. J. J. 2001. Vermicomposta, micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cáscara. *Terra Latinoamericana*. 19: 241-248.
- Xu, G., Wolf, S. and Kafkafi, U. 2002. Ammonium on potassium interaction in sweet pepper. *Journal of Plant Nutrition*. 25: 719-734.
- Zaller, G. J. 2007. Vermicompost as a substitute for peat in potting media: Effects on germination, biomass allocation, yields and fruit quality of three tomato varieties. *Scientia Horticulturae*. 112: 191-199.

Caracterización hidrodinámica del modelo de Green y Ampt en un suelo con mejoradores orgánicos

Hydrodynamic characterization of the Green and Ampt model in a soil with organic improvers

Lugo-Valenzuela H¹, Prado-Hernández JV¹, Vázquez-Peña MA¹, Pineda-Pineda J², Velázquez-López N³

¹ Departamento de Investigación y Posgrado en Irrigación, Universidad Autónoma de Chapingo, Carretera Federal México- Texcoco Km 38.5, CP 56230, Texcoco, México.

² Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico Superior de Guasave. Carretera Internacional entronque a carretera La Brecha, Ejido Burrioncito, CP 81149, Sinaloa, México.

RESUMEN

En la agricultura la eficiencia del agua y el equilibrio de oferta y demanda en cultivos son primordial. La falta de conocimientos en proceso de infiltración en riego por gravedad, aumenta en cultivos de alta demanda como maíz, sorgo y frijol. Conocer la retención de humedad en suelos agrícolas es importante, para satisfacer la demanda en la agricultura. Esta investigación tuvo como objetivo estudiar el movimiento hidrodinámico del agua en ocho tratamientos, mezclados de manera homogénea, con aditivos orgánicos y suelo agrícola (franco arcilloso), analizando beneficios en riego por gravedad (Intervalo de riego). La infiltración (F), se analizó con el modelo de Green y Ampt; se evaluaron propiedades físicas directas e indirectas, como son el contenido volumétrico de agua a saturación (θ_s) y presión capilar frente de humedecimiento (ψ_f), curva de tensión de humedad, el segundo parámetro aplicando método de Brooks y Corey (1964), y conductividad hidráulica (Ks). Los resultados son variables relacionando al testigo, mejoradores orgánicos incrementaron un 30 % la retención de humedad y el intervalo de riego incrementó seis días. El incremento en retención de humedad e infiltración acumulada, se obtuvieron con material orgánico (T2) y material orgánico (T7), y obtenidos en residuos en cosecha de maíz.

Palabras clave: Enmienda orgánica; infiltración; retención de humedad; modelación matemática.

ABSTRACT

In agriculture, water efficiency as well as supply and demand balance in crops are essentials. The lack of knowledge in the infiltration process in gravity irrigation increases in high-demand crops such as corn, sorghum and beans. Knowing the moisture retention in agricultural soils is important to satisfy the demand in agriculture. The purpose of this research was to study the hydrodynamic movement of water in eight treatments, mixed homogeneously, with organic additives and agricultural soil (clay loam), analyzing benefits in gravity irrigation (irrigation interval). Infiltration (F) was analyzed with the Green and Ampt model; direct and indirect physical properties were evaluated, such as the volumetric water content at saturation (θ_s) and capillary pressure against wetting (ψ_f), humidity tension curve, the second

parameter applying the Brooks and Corey (1964) method, and hydraulic conductivity (Ks). The results are variable in relation to the control, organic improvers increased moisture retention by 30% and the irrigation interval increased by six days. The increase in moisture retention and accumulated infiltration, were obtained with organic material (T2) and organic material (T7), in corn harvest residues.

Keywords: Organic amendment, infiltration, moisture retention, mathematical modeling

INTRODUCCIÓN

En la agricultura es necesario hacer un uso eficiente del agua y proveer una solución al uso óptimo de este recurso para equilibrar la oferta y la demanda, ya que en regiones semiáridas y áridas existe una creciente competencia entre los limitados recursos hídricos y la creciente demanda por los cultivos (Li *et al.*, 2012). Para incrementar la eficiencia de aplicación en los métodos de riegos superficial es necesario entender el proceso de infiltración, que permite calcular el tiempo óptimo de riego (Barry *et al.*, 2005), conociendo la curva de retención de agua en el suelo, que se define como la relación entre el contenido volumétrico de agua y el potencial mátrico que determinan el flujo de agua en la zona no saturada (Moret y Latorre, 2016). Esta relación es fundamental para estudiar el drenaje, proceso de infiltración, conductividad hidráulica, programación de riegos y estrés hídrico en las plantas, además, es una variable esencial en los modelos hidrológicos y balances hídricos (Solon *et al.*, 2012). Existen materiales considerados como mejoradores del suelo que, por sus características físicas y químicas, ayudan a mejorar la retención de humedad, entre ellos están los hidrogeles y otros materiales orgánicos obtenidos por pirólisis de la biomasa residual de plantas, que promueven tanto la retención del agua como la de nutrientes (Opatokun, 2017). La infiltración es el componente del ciclo hidrológico que conecta el flujo superficial y el agua subterránea, esta propiedad del suelo es importante en el diseño de sistemas de riego y drenaje, transporte de sedimentos y solutos, manejo de cuencas (Ali *et al.*, 2016), estimación de escurrimiento hidrológico y recargas de acuíferos (Van den Putte *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2016). Se ha desarrollado un gran número de modelos para calcular la infiltración acumulada y la tasa de infiltración,

*Autor para correspondencia: Homero Lugo Valenzuela
 Correo electrónico: hlv_300@hotmail.com

Recibido: 17 de diciembre 2021

Aceptado: 6 de enero 2022

tales modelos se clasifican en empíricos como el propuesto por Kostikov (1932) y en semi-empíricos y físicos (Muñoz-Carpena y Gowdich, 2005). El primero no es capaz de describir el proceso de infiltración a detalle, sin embargo, los modelos basados en principios físicos describen con mayor detalle dicho proceso; entre los modelos físicos se encuentra el modelo de Richard y el de Green y Ampt (Ali *et al.*, 2016; Deng y Zhu, 2016). La ecuación de infiltración de Green y Ampt es una de las más extensamente usadas en la simulación del proceso de infiltración (Ali *et al.*, 2016) y de erosión (Mao *et al.*, 2016), ya que aplica directamente la ley de Darcy. Además, debido a la simplicidad y precisión en su resolución, este modelo se utiliza para simular la infiltración vertical en una dimensión en el suelo (Green y Ampt, 1911), a diferencia del modelo complejo de Richard, que requiere una técnica numérica implícita iterativa discreta en el tiempo y en el espacio para su solución, que implica un alto costo computacional (Rao *et al.*, 2009). El modelo de Green y Ampt se aplica en suelos uniformes, estratificados, condiciones de precipitación estable o inestables y condiciones homogéneas en contenido de agua (Deng y Zhu, 2016; Rao *et al.*, 2009; Haibili y Heidarpour, 2015), ya que asume una conductividad hidráulica constante y un porcentaje en el contenido de agua en la zona de humedecimiento y una carga negativa constantes en el frente de mojado (Haibili y Heidarpour, 2015). Este conjunto de propiedades físicas del suelo, involucradas en su uso y manejo, son importantes para entender en qué medida y cómo influyen en el crecimiento de las plantas (Thompson y Troeh, 1988). Algunas modificaciones al modelo que se han propuesto se han combinado con los eventos de precipitación y han sido adoptadas en programas computacionales de modelación de cuencas como el SWAT (Neitsch *et al.*, 2002) y HEC-HMS (USACE, 2001). Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estudiar la retención de agua y la infiltración del agua en un suelo agrícola franco arcilloso con y sin mejoradores orgánicos en diferentes proporciones, para estimar el tiempo de riego por gravedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de drenaje y física de suelos del Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada a 19° 20' latitud norte, 98° 53' longitud oeste, 2240 m. Este consistió en la toma de 15 muestras de un kg de suelo en forma homogénea y estratificada a una profundidad de 30 cm, en un terreno ubicado en el distrito de riego número 35 "el Burrión" en Guasave, Sinaloa, México. Se determinaron los intervalos de riegos para cultivo de maíz para el ciclo agrícola otoño-invierno con la información climatológica del lugar más cercano al sitio experimental en Guasave, Sinaloa. La evapotranspiración se calculó aplicando el método de Blaney y Criddle (1950). Se obtuvieron los costos de producción de los tratamientos, que consistieron en mezclas en diferentes proporciones de suelo con los materiales orgánicos que se usaron como mejoradores de suelos. Los mejoradores orgánicos se obtuvieron a partir de los residuos de cosecha del cultivo de

maíz. Se aplicó material procesado mediante pirólisis y no procesado (material orgánico sin ninguna modificación), e hidrogel sintetizado a partir de pectinas del extracto del fruto de tejocote, mediante hidrólisis ácida (Heano, 2012). Se estableció un experimento con ocho tratamientos que se formaron con la adición de diferente dosis de mejorador, los cuales se establecieron en un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones de cada uno. Se utilizaron 8 muestras de suelo con textura franco arcilloso, las cuales fueron procesadas a través del tamiz No. 10 para obtener partículas menores de 2 mm de diámetro. Estas muestras de suelo se mezclaron con diferentes proporciones de los materiales orgánicos evaluados como mejoradores de suelo. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: T1 = Suelo sin mejorador (testigo); T2 = Suelo + 20 g material procesado; T3 = Suelo + 20 g material sin procesar; T4 = Suelo + 20 g hidrogel; T5 = Suelo + 40 g material procesado; T6 = Suelo + 40 g material sin procesar; T7 = Suelo + 40 g hidrogel y T8 = Suelo + 20 g material procesado + 20 g material sin procesar + 20 g hidrogel.

Variables medidas y estimadas en laboratorio

Las variables que se midieron en laboratorio (propiedades físicas directas) para cada tratamiento fueron: la densidad aparente ρ_b (método de la parafina), conductividad hidráulica K_s (permeámetro de carga constante), porosidad total η , humedad inicial (método gravimétrico), densidad real ρ_a (método del picnómetro), saturación efectiva (S_e), textura (método de Day), humedad a capacidad de campo (CC), humedad en el punto de marchitez permanente (PMP) y se obtuvo la curva de retención de humedad mediante el método de la olla de presión; a partir de dicha curva se obtuvieron la humedad inicial, humedad a saturación (Θ_s), presión de entrada del aire (ψ_b) y presión capilar en el frente de humedecimiento (ψ_f), humedad residual (Θ_r) e índice de porosidad (β) (Prado *et al.*, 2017).

Modelo de infiltración de Green y Ampt

W. H. Green y G. A. Ampt (Jintao *et al.*, 2008) desarrollaron el primer modelo físico del proceso de infiltración. Este modelo describe ecuaciones simples para describir el cálculo de la infiltración. Green y Ampt lograron simplificar la teoría de la infiltración considerando el frente de humedecimiento. La Ecuación 1 de infiltración de Green y Ampt tiene tres parámetros que se necesitan estimar, estos son la conductividad hidráulica a saturación K_s ($\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$), la carga de presión capilar en el frente de humedecimiento ψ_f (cm) y el contenido del cambio de humedad, el cual es la diferencia entre la porosidad y el contenido de agua inicial del suelo θ_i .

$$F(t) = K_s t + \lambda \ln\left(1 + \frac{F(t)}{\lambda}\right) \quad (1)$$

$$\lambda = (p + \psi_f)(\Theta_s - \theta_i) \quad (2)$$

Donde $F(t)$ es la infiltración acumulada (cm), t es el tiempo (h), ψ_f es la carga de presión capilar en el frente de

humedecimiento (cm), p es la profundidad del agua sobre la superficie (cm), θ_i y θ_s son los contenidos volumétricos de agua en el suelo inicial y a saturación, respectivamente ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$), y K_S es la conductividad hidráulica a saturación ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$). Corey y Brooks (2009) estudiaron las variaciones de la carga de succión ψ , con el contenido de humedad θ , en diferentes tipos de suelo y encontraron una relación gráfica y empírica entre la succión del suelo y la saturación efectiva S_e conocida como la ecuación de Brooks-Corey (1964) (Ecuación 3).

$$S_e = \left[\frac{\psi_b}{\psi} \right]^\beta \quad \text{para } \psi \geq \psi_b \quad (3)$$

Donde ψ es la presión capilar (cm), β es el índice de distribución de tamaño de poros ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$), ψ_b es la presión de entrada del aire (cm).

La saturación efectiva se puede expresar como la relación entre la humedad disponible $\theta - \theta_r$ (condición inicial) y el máximo contenido de humedad en el suelo o porosidad efectiva ϕ_e (Ecuación 4) (Van Genuchten, 1980).

$$S_e = \frac{\theta - \theta_r}{\phi_e} \quad (4)$$

Dónde: θ es el contenido de humedad ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$) correspondiente a una presión capilar ψ , θ_r es el contenido de humedad residual drenado ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$) y ϕ_e es la porosidad efectiva $\eta - \theta_r$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$), donde η es la porosidad total.

La presión capilar del frente de humedecimiento se obtuvo de la integración de la ecuación de Brooks y Corey (1964) de la conductividad hidráulica relativa a través de la (Ecuación 5) (Rawls *et al.*, 1982; Xiang *et al.*, 2015; Prado *et al.*, 2017).

$$\psi_f = \frac{2+3\beta}{1+3\beta} \left(\frac{\psi_b}{2} \right) \quad (5)$$

Dónde: ψ_b es la presión de entrada de aire (cm) y β tiene el mismo significado que en la Ecuación 3.

Los parámetros ψ_b y β se obtuvieron resolviendo las Ecuaciones (3) y (4), dos formas de calcular la saturación efectiva del suelo (S_e), empleando las curvas de retención de humedad del suelo (Brooks y Corey, 1964) propiedades físicas indirectas que se obtienen de gráficos.

Obtención de las curvas de tensión de humedad del suelo

Las curvas de tensión de humedad se obtuvieron de muestras de 20 g de suelo por tratamiento, con tres repeticiones, las cuales se colocaron en cilindros (5.1 cm de diámetro y 5 cm de altura) y se determinó el contenido de humedad mediante el método de la olla de presión (Wang *et al.*, 2013) a tensiones (ψ) de 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 16 y 17 atm. Se determinó el contenido de humedad (θ) de cada tratamiento para cada presión aplicada mediante el método gravimétrico, y con la densidad aparente del suelo se convirtió a humedad volumétrica. Se

graficaron los pares de puntos (θ , ψ) como lo describe Prado *et al.* (2017).

Calibración y ajuste estadístico del modelo de Green y Ampt.

Para encontrar el valor de los parámetros del modelo de Green y Ampt (ψ_b y β) se aplicó el método de mínimos cuadrados no lineales, el cual establece que: dado un vector de parámetros, encontrar el error mínimo entre los valores predichos por el modelo y los datos medidos en laboratorio, Ecuaciones 6 y 7.

$$\hat{p} = \arg \min J(p) \quad (6)$$

$$J(p) = \sum_{h=1}^L \sum_{i=1}^M (\bar{y}_h(t_i, p) - y_h(t_i))^2 \quad (7)$$

Donde $\bar{y}_h(t_i, p)$ son los valores estimados por el modelo en el tiempo t_i , $y_h(t_i)$ son los valores medidos y_h en el tiempo t_i , L es el número de salidas, M es el número de mediciones, p es el vector de parámetros en la calibración, \hat{p} es el vector de parámetros con errores minimizados. Para evaluar la bondad de ajuste del modelo (S_e de la Ecuación 3), a los valores medidos (S_e de la Ecuación 4) se calcularon: el coeficiente de correlación (r), el sesgo (BIAS) y la raíz del cuadrado medio de los errores (RMSE) con el uso de los programas R-Proyect (2.14.2) y R Development Core Team (2011) y análisis bibliográfico se utilizó el editor Mendeley Support Team, (2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de tensión de humedad

En la Figura 1 se presenta la curva de tensión de humedad que caracterizó a cada uno de los tratamientos experimentales, en esta se aprecia la variabilidad en la capacidad de almacenamiento del agua de los ocho tratamientos, siendo el tratamiento testigo T1 (Suelo sin ningún mejorador) el que presentó los valores más bajos, con un contenido de humedad a capacidad de campo (θ_{CC}) de $0.41 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ y un punto de marchitez permanente (θ_{PMP}) de $0.135 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$. Los cuatro tratamientos con mayor capacidad de retención fueron: T2, T7, T6 y T5, cuyos valores de θ_{CC} y θ_{PMP} respectivamente, fueron (0.44 y $0.15 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$), (0.44 y $0.15 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$), (0.35 y $0.15 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$) y (0.41 y $0.15 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$); mientras que los tratamientos T8 (0.38 y $0.14 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$), T3 (0.37 y $0.14 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$) y T4 (0.39 y $0.14 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$).

Se aprecia el incremento de humedad retenida por los tratamientos con materiales orgánicos, los cuales tienen una diferencia de hasta el $0.10 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ de agua retenida, donde los mejores tratamientos (T2 y T7) fueron con aditivos orgánicos. En el tratamiento T7 se encontró el mayor almacenamiento de agua fácilmente disponible (30%) para la planta.

En la Tabla 1 se presentan, el coeficiente de correlación (r), el sesgo (BIA) y la raíz del cuadrado medio del error (RMSE); se observa que en todos los tratamientos el sesgo fue menores a 0.014 correspondiendo el valor más bajo para el tratamiento 8; en general los valores de r fueron cercanos a

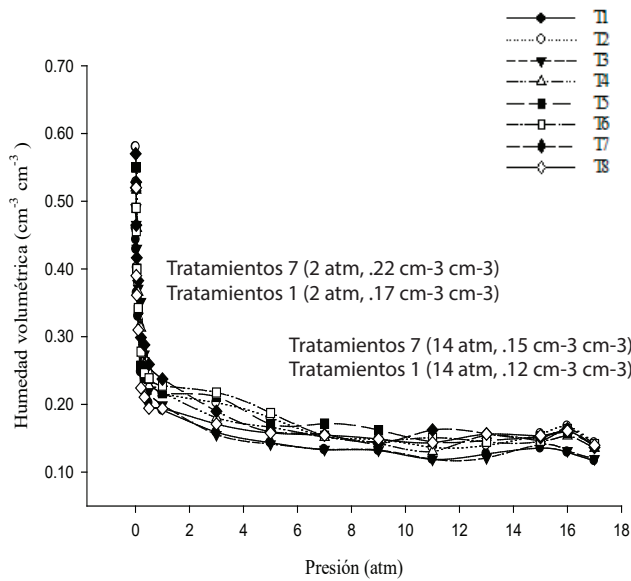


Figura 1. Curvas de retención de humedad de suelos tratados con mejoradores orgánicos.

Figure 1. Moisture retention curves of soils treated with organic improvers

la unidad, lo que indica un excelente ajuste de los datos; el valor más pequeño de RMSE se obtuvo en el tratamiento 4, esto indica la precisión del método. De acuerdo a los ajustes encontrados, se deduce que las estimaciones de la saturación efectiva y las medidas mediante el método volumétrico son similares (Tabla 2). De acuerdo a las investigaciones realizadas por Prado *et al.* (2017), los valores de ψ_f son confiables para utilizarlos en el modelo de Green y Ampt. Las variables estimadas y medidas son confiables para determinar la infiltración acumulada en suelos, pero no son confiables para todo tipo de suelo (Green y Ampt, 1911).

Tabla 1. Ajustes estadísticos de las curvas de saturación efectiva del suelo tratado con mejoradores orgánicos.

Table 1. Statistical adjustments of the effective saturation curves of soil treated with organic improvers.

Criterio	Tratamientos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
R	0.93	0.98	0.95	0.98	0.97	0.89	0.89	0.96
Sesgo	0.02	0.01	0.01	0.09	0.09	0.01	0.05	0.01
RMSE	0.05	0.04	0.07	0.03	0.04	0.03	0.04	0.06

En el Tabla 2 se muestran características físicas que resultaron de la estimación del modelo de Green y Ampt. Para resolver problemas de flujo en suelo no saturado a menudo se requiere el conocimiento de las propiedades hidráulicas del suelo, la distribución del tamaño de partícula, densidad aparente y contenido de materia orgánica (Van Genuchten y Leij, 1980). Binayak (1999), menciona que las propiedades hidráulicas del suelo son importantes para la predicción del

flujo de agua en suelos con macro porosidad alta (Textura gruesa).

La conductividad hidráulica (K_s) fue la propiedad que más se modificó debido al cambio de porosidad, a mayor porosidad mayor conductividad hidráulica (Tabla 2), esto se debe al efecto positivo de la mayor cantidad de materia orgánica en los tratamientos, lo que implicaría un menor tiempo de riegos en cultivos agrícolas, por el incremento en la capacidad de retención debido a que la adición de mejoradores orgánicos, modifican las propiedades físicas en los suelos; se observó que los tratamientos con materia orgánica procesado (T2) y sin procesar (T6), mostraron mejores características; mientras que la aplicación del gel (T8) y tratamiento testigo (T1) no mostraron mejorías en dichas propiedades. El riego con agua subterránea altamente salada, la liberación de agua de mar en las zonas costeras y la acumulación de sales en regiones áridas son las principales causas de la salinidad de los suelos sin materia orgánica (Clarenc *et al.*, 2020).

Tabla 2. Parámetros físicos e hidrodinámicos del suelo tratado con diferentes mejoradores orgánicos.

Table 2. Physical and hydrodynamic parameters of the soil treated with different organic improvers.

Parámetros físicos obtenidos en forma directa									
	Símbolo	Tratamientos							
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Densidad aparente (g cm ⁻³)	ρ_b	1.2	1	1	1	1	1.1	1.1	1.1
Densidad real (g cm ⁻³)	ρ_s	2.6	2.6	2.5	2.4	2.4	2.4	2.7	2.5
Porosidad total (cm)	H	0.5	0.6	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6
Conductividad hidráulica (mm h ⁻¹)	K_s	4.8	7.9	5.6	6.1	7.9	8.5	7.4	5.9
Humedad a capacidad de campo (cm ³ cm ⁻³)	θ_{cc}	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3
Humedad a punto de marchitez permanente (cm ³ cm ⁻³)	θ_{PMP}	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Parámetros físicos obtenidos en forma indirecta									
Presión de entrada de aire (cm)	ψ_b	17	13	15	14	17	13	12	17
Índice distribución de poros (cm ³ cm ⁻³)	B	0.5	0.7	0.5	0.8	0.6	0.3	0.7	0.5
Presión capilar en el frente de humedecimiento (cm)	ψ_f	32	31	31	35	34	21	29	33
Humedad de saturación (cm ³ cm ⁻³)	θ_s	0.4	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4
Humedad residual (cm ³ cm ⁻³)	θ_r	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Curvas de infiltración acumulada

En la Figura 2 se muestra el comportamiento de la lámina infiltrada acumulada del modelo de Green y Ampt de los 8 tratamientos, los cuales parten de una humedad inicial del 0.15 cm³·cm⁻³. Para un tiempo de oportunidad de una hora se observa claramente una mayor lámina de agua infiltrada en el suelo con mejoradores orgánicos que en el

testigo, maximizándose en el suelo con 40 g hidrogel (T7), con los que se podría tener mayor uniformidad del patrón de láminas infiltradas en el riego por gravedad. Se han evaluado modelos como el de Richard para determinar la infiltración acumulada (Raó, 2006). Sin embargo, este modelo es difícil de implementar por la cantidad de parámetros involucrados; por otro lado, es más factible la aplicación del modelo de Green y Ampt, para el manejo del riego en suelos agrícolas y predice de manera aceptable la tasa de infiltración (Prado *et al.*, 2017). Machiwal *et al.*, (2006) menciona que es posible que la alta variabilidad de los parámetros de los modelos de infiltración, no permitan encontrar un patrón definido de valores, como fue reportado por Machiwal *et al.*, (2006). De acuerdo con esta investigación, los mejoradores orgánicos obtenidos de biomasa seca, ricos en polímeros naturales, procesados por pirólisis pueden ser utilizados para retener humedad en suelos agrícolas, resultados que concuerdan con los encontrados por Xiang *et al.* (2015)

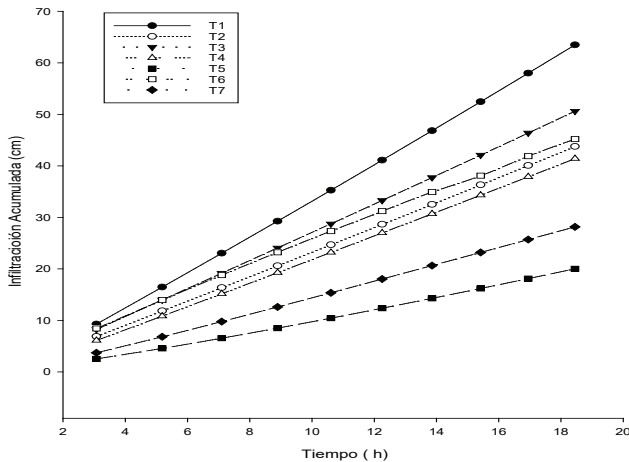


Figura 2. Infiltración acumulada (F) en suelo tratado con diferentes mejoradores orgánicos.

Figure 2. Accumulated infiltration (F) in soil treated with different organic improvers.

Cantidad y frecuencia de riegos requeridos

En la Figura 3 se muestra la cantidad de riegos que se deben aplicar en un suelo franco arcilloso con diferentes mezclas de materiales orgánicos como mejoradores de suelos. Se observa que existe una diferencia marcada en los intervalos de riegos para todos los tratamientos evaluados; los tratamientos T1, T2, T4, T5, T6 y T8 requieren mayor cantidad de riegos, pero T3 y T7 requieren un riego menos, de acuerdo al calendario de riegos que se aplica de manera normal que el agricultor aplica en el periodo de siembra (5 riegos), los riegos evaluados de acuerdo a datos calculados serían para T1=5, T2=5, T3=4, T4=5, T5=6, T6=6, T7=4 y T8=7 como se muestra en la figura 3, donde el mejor aditivo es el T3 y T7 por lo que fueron los mejores tratamientos donde se utiliza menos agua, estudios realizados en laboratorio de física de suelos en la Universidad Autónoma de Chapingo. Esto indica un beneficio para los módulos de riego al reducir la cantidad

de agua utilizada en un sistema de riego por gravedad sin que la planta sufra algún daño por estrés hídrico.

Con estos resultados existe evidencia suficiente para justificar la adición de materiales orgánicos, ya que se podrían aumentar los intervalos en el tiempo de riego y disminuir la cantidad de agua utilizada por los cultivos, lo que propiciaría un ahorro sustancial del vital líquido utilizado por los cultivos.

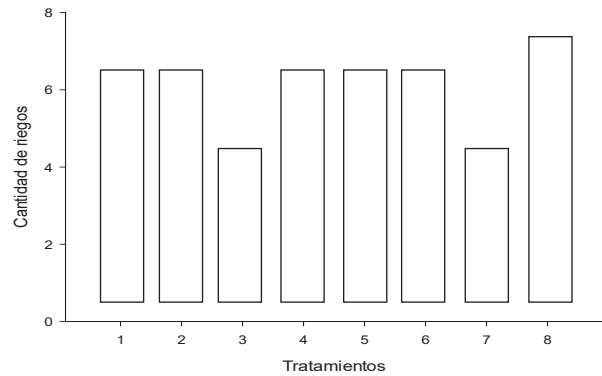


Figura 3. Número de riegos en suelo tratado con diferentes mejoradores orgánicos en riego por gravedad.

Figure 3. Number of irrigations in soil treated with different organic improvers with gravity irrigation.

Estudio de viabilidad de acuerdo a costos de producción de los mejoradores orgánicos.

Se realizaron las proyecciones de los costos de producción de los mejoradores orgánicos de suelo, para una tonelada de producción, en donde se obtuvieron los siguientes resultados en pesos (\$): T1 (0), T2 (200), T3 (300.3), T4 (18,208), T5 (452.3), T6 (17,304), T7 (18,404), T8 (18,798). El mejorador orgánico más rentable de acuerdo a su retención de humedad es el material procesado con pirólisis. En forma general, sustratos orgánicos elaborados con la glucosa ha sido la mayor fuente de carbono utilizada en los procesos fermentativos, obteniéndose altos rendimientos de biomasa y productividad de lípidos en comparación con otras fuentes de carbono (Silva-Rodríguez *et al.*, 2021). Los hidrogeles son materiales de un costo alto de producción, según estudios realizados por Mehmet (2014). Los altos costos (\$) de algunos materiales orgánicos mejoradores de suelos son razones suficientes por las cuales no se aplican a suelos agrícolas, además de que pueden causar daños a los suelos de acuerdo a los materiales sintéticos utilizados (hidrogel) (Hernández, 2012). Una de las ventajas de los materiales procesados con pirólisis, a partir de residuos de maíz, es que ayudan a mejorar las propiedades físicas y químicas de los suelos y son de bajo costo, ya que son elaborados de materiales prácticamente de desecho. En el Estado de Sinaloa el residuo de maíz es un material que existe en abundancia por las grandes superficies agrícolas destinados a la siembra de este cultivo (CONAGUA, 2020).

CONCLUSIONES

El modelo de Green y Ampt como herramienta para describir el proceso de infiltración mostró alto grado de confiabilidad en suelos con adición de mejoradores orgánicos, con la ventaja de ser un modelo basado en principios físicos y fáciles de implementar por su estructura matemática simplificada. Las adiciones de diferentes mejoradores orgánicos aumentaron en un 30% la retención de humedad, en un 5% la conductividad hidráulica (K_s) y en 7% la porosidad total (η), parámetros del modelo de Green y Ampt que resultó adecuado para predecir la velocidad de infiltración del agua en el suelo. La adición de mejoradores orgánicos de suelo incrementó el intervalo y disminuyó el número de riegos en suelos de textura franco arcilloso en Guasave, Sinaloa.

La aplicación al suelo de mejorador orgánico procesado podría ser una alternativa viable para el sector agrícola por su alto grado de retención de humedad, su bajo costo de producción y por su disponibilidad, en Guasave Sinaloa, México.

REFERENCIAS

- Ali, S., Islam, A., Mishra, P. K. y Sitka, A. K. 2016. Green and Ampt approximations: A comprehensive analysis. *Journal of Hydrology*. 535: 340-355.
- Barry, D. A., Parlance, J. Y., Li, L., Jing, D. S. y Crapper, M. 2005. Green and Ampt approximations. *Advances in Water Resources*. 28(10): 1003-1009.
- Binayak, P.M. 1999. Scaling hydraulic properties of a macroporous soil. *Water Resources Research*. 35(6): 1927-1931.
- Blaney, H.F. y Criddle, W.D. 1950. Determining water requirements in irrigated areas from climatological and irrigation data. 48va ed. Soil Conservation Service. Washington, D.C, U. S. A.
- Brooks, R. H. y Corey, A. T. 1964. Hydraulic properties of porous media. En: *Hydrology and Water Resources Program*. Royal Harvard (ed.). pp. 27. Colorado State University.
- Clarenc, A. R., Castellanos-Hernández, O. A., Rodríguez-Sahagún, A. y Acevedo-Hernández, G. J. 2020. Effect of saline stress on the morphology and phytochemistry of in vitro grown Mexican oregano (*Lippia grave lens* Knuth). *Biotecnia*. 22(3): 131-137.
- CONAGUA (Comisión Nacional Del Agua), 2020. Estadísticas agrícolas de hidrométrica producción en México. <http://www.edistritos.com/DR/estadisticaAgricola/cultivo.php>.
- Corey, A.T. y Brooks R. H. 2009. The Brooks-Corey relationships. In Van Genuchten MT, Leij FJ, Wu L (Eds.) *Proc. Int. Workshop on characterization and measurement of the hydraulic properties of unsaturated porous media*. Riverside. 1: 13-18.
- Deng, P. y Zhu, J. 2016. Analysis of effective Green and Ampt hydraulic parameters for vertically layered soils. *Journal of Hydrology*. 538: 705-712.
- Green, W.H., y Ampt, G. 1911. Study in soil physics. I. The flow of air and water through soils. *Journal of Agriculture Science*. 4:1-24.
- Habili, M. J., y Heidarpour, M. 2015. Application of the Green and Ampt model for infiltration into layered soils. *Journal of Hydrology*. 527: 824-832.
- Heano, E. C. 2012. Extracción y caracterización de pectinas de cáscara de plátanos, Tesis Doctoral. Universidad de Colombia.
- Hernández, M. V. 2012. Caracterización de aditivos carbonáceos para extracción de fluoruros del agua con materiales orgánicos aplicando pirolisis. *Journal of Hydrology*. 2: 23-25.
- Jintao, L., Jiabao, Z. y Jie, F. 2008. Green and Ampt model for layered soils with non-uniform initial water content under unsteady infiltration. *Soil Science Society of America Journal*. 72(4): 1041-1047.
- Kostiakov, A. 1932. On the dynamics of the coefficient of water percolation in soils and on the necessity for studying it from a dynamic point of view for purposes of amelioration. *International Society of Soil Science*. 6: 17-21.
- Li, Y., Kinzelbach, W. y Zhou, J., C. 2012. Modelling irrigated maize with a combination of coupled-model simulation and uncertainty analysis, in the northwest of China. *Hydrology and Earth System Sciences*. 15: 1465-1480.
- Machiwal, D., Jha, M.K. y Mal, B.C. 2006. Modelling infiltration and quantifying spatial soil variability in a wasteland of kharagpur, India. *Biosystems Engineering*. 95: 569-82.
- Mao, L., Li Y., Hao W., Zhou X. y Xu C. L. T. 2016. A new method to estimate soil water infiltration based on a modified Green and Ampt model. *Soil and Tillage Research*. 161: 31-37.
- Mendeley Support Team. Getting Started with Mendeley [Internet]. Mendeley Desktop. 11: 1-16. [8 Jun 2011] Disponible en: <http://www.mendeley.com>
- Mehmet, Kucukmehmetoglu, A. G. 2014. The significance and impacts of large investments over the determination of irrigated agricultural land use: The case of the Euphrates and Tigris river basin. *Land Use Policy*. 53: 514-52.
- Moret, F. y Latorre. 2016. Estimate of the soil water retention curve from the sorptivity and parameter calculated from an upward infiltration experiment. *Journal of Hydrology*. 22: 95-98.
- Muñoz-Carpena, R. y Gowdsh, L. 2005. Aplicación del método de infiltración de Green and Ampt con redistribución de humedad del suelo entre encharcamientos. VII Jornada de investigación en zonas no saturada del suelo. 205-213.
- Neitsch, S.L., Arnold, J.G., Kiniry, J.R., Williams, J.R. y King, K.W. 2002. Soil and water assessment tool theoretical documentation. Texas Water Resources Institute. 191: 123-234.
- Opatokun, S. A. 2017. Agronomic assessment of pyrolysed food waste digestate for sandy. *Journal of Environmental Management*. 187: 24-30.
- Prado Hernández, J. V., Pascual Ramírez, F., Cristóbal Acevedo, D., Carrillo García, M., Hernández Saucedo, F. R. y Martínez Ruíz, A. 2017. Evaluation of Green and Ampt infiltration equation in some agricultural soils in México, using USDA information and a modified method from Brooks and Corey. *Interciencia*. 42(9): 563-569.
- Core Team, R. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna. Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>.
- Rao, M.D., Raghuvanshi, N.S. y Singh, R. 2009. Development of a physically based 1D- infiltration model for seal formed irrigated soils. *Agricultural Water Mananagent*. 85: 165-174.
- Rawls, W. J., Brakensiek, D. L., y Saxton, K. E. 1982. Estimation of soil water properties. *Transaction of the ASAE*: 1316-1328.
- Silva-Rodríguez, D., Beltrán-Guilarte, Y., Ángulo-Mercado, E. R. y Quilodrán-Tolosa, B. H. 2021. Comparative study of the production of biomass and omega 3 and 6 in *Thraustochytrium kinneyi*. *Biotecnia*. 23(2): 73-80.

- Solone, R., Battelle, M., Tommie, F., y Morari, F. 2012. Errors in water retention curves determined with pressure plates: Effects on the soil water balance. *Journal of Hydrology*. 470-471: 65-74.
- Thompson, L. M., y Troeh, F. R. 1988. *Los suelos y su fertilidad*. Editorial Reverte.
- USACE-H. US Army Corps of Engineers, H. E. C. 2001. *Hydrologic modeling system HECHMS User's Manual*. USACE-HEC. Davis.
- Van den Putte, A., Govers, G., Leys, A., Langhans, C., Clymans, W. y Diels, J. 2013. Estimating the parameters of the Green and Ampt infiltration equation from rainfall simulation data: Why simpler is better. *Journal of Hydrology*. 476: 332-344.
- Van Genuchten, M.Th. 1980. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. *Soil Science Society of America Journal*. 44 (5): 892-898.
- Van Genuchten, M. Th. Leij, F. J. y Yates, S. R. 1991. The RETC code for quantifying the hydraulic functions of unsaturated soils. Robert S. Kerr Environmental research laboratory, U.S. environmental protection agency.
- Wang, H., Xiao, B., Wang, M. y Shao, M. 2013. Modeling the soil water retention curves of soil-gravel mixtures with regression method on the loess plateau of China. *PLOS ONE*. e59475. 10.1371/journal.pone.0059475.
- Xiang, L., Ling W., Zhu Y., Chen L. y Yu Z. 2015. Self-adaptive Green and Ampt infiltration parameters obtained from measures moisture process. *Water Science and Engineering*. 9(3): 256-264.
- Yin, H. B. y Patel, J. 2018. Comparison of methods to determine the microbial quality of alternative irrigation waters. *Agricultural Water Management*. 201: 38-45.

Efecto hidrodinámico y producción de maíz (*Zea mays* L.) en un suelo franco arcilloso aplicando un aditivo orgánico en Guasave, Sinaloa, México

Hydrodynamic effect and corn (*Zea mays* L.) production in a clay loam soil with the application of an organic additive in Guasave, Sinaloa, Mexico

Lugo-Valenzuela H¹, Prado-Hernández JV¹, Vázquez-Peña MA¹, Pineda-Pineda J², Velázquez-López N²

¹ Departamento de Investigación y Posgrado en Irrigación, Universidad Autónoma de Chapingo, Carretera Federal México- Texcoco Km 38.5, Universidad Autónoma de Chapingo, 56230 Texcoco, México.

² Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico Superior de Guasave (TecNm-ITSG, Carretera Internacional entronque a carretera La Brecha, Ejido Burrioncito, 81149, Sinaloa, México.

RESUMEN

Las sequías recurrentes y la competencia por agua son principales amenazas al desarrollo del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en zonas agrícolas de Sinaloa, México. Sinaloa es el principal productor de maíz, pero se aplica una excesiva cantidad de agua en riego por gravedad, situación que debe disminuir sin mermar rendimientos en cultivos. Existen formas de mejorar las condiciones de humedad en los suelos, son: labranza mínima y de conservación, geles sintéticos, que permiten la retención de humedad en los suelos. La baja disponibilidad y alta competencia hídrica, se requiere estrategias para mejorar la retención de agua, los aditivos orgánicos son una alternativa. Esta investigación tiene como objetivo conocer efectos movimiento del agua, tiempos de riego (mínimo y máximo), gasto (litros) y producción de maíz (kg), aplicando riego por gravedad con aditivo orgánico (soca de maíz procesado con pirólisis). Se elaboró un diseño experimental de 3x3. Los tratamientos fueron: testigo T1 (suelo normal), tratamiento T2 (suelo + 250 kg/ha⁻¹), tratamiento T3 (suelo + 500 kg/ha⁻¹). Se encontró efecto positivo en el incremento de retención de humedad del suelo con aditivo orgánico con 250 y 500 kg/ha⁻¹ y una mayor producción de grano de maíz conforme incrementó la dosis del aditivo orgánico.

Palabras clave: Siembra de maíz; gasto de agua; aditivo orgánico; producción de maíz.

ABSTRACT

Recurring droughts and competition for water are the main threats to the development of maize (*Zea mays* L.) cultivation in agricultural areas of Sinaloa, Mexico. Sinaloa is the main producer of corn, but an excessive amount of water is applied with gravity irrigation, a situation that should be reduced without reducing crop yields. There are ways to improve soil moisture conditions, including minimum and conservation tillage, synthetic gels, which allow soil moisture retention. The low availability and high competition for water, strategies are required to improve water retention, with organic additives as one alternative. The objective of this research is to know the hydrodynamic effects of water, irrigation times (minimum and maximum), expenditure (liters)

and corn production (kg), applying gravity irrigation with an organic additive (processed corn straw). An experimental 3x3 design was elaborated. The treatments were: control T1 (normal soil), treatment T2 (soil + 250 kg/ha), treatment T3 (soil + 500 kg/ha). A positive effect was found in the increase retention of moisture in soil with organic additive at 250 and 500 kg/ha, and a higher production of corn grain as the dose of organic additive increased.

Keywords: Corn planting; water use; organic additive; corn production.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos de cereales más importantes de México y juega un papel importante en la seguridad alimentaria. El maíz (*Zea mays* L.) es fuente de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva, pueden obtenerse por hidrólisis de harina de gluten de maíz (HGM), como subproducto de molienda húmeda (Montoya-Rodríguez *et al.*, 2020). Las sequías recurrentes y la competencia por el agua son las principales amenazas al desarrollo de este cultivo en Sinaloa; por tanto, la agricultura de riego por gravedad debe disminuir los volúmenes aplicados de agua sin una merma en los rendimientos (Conagua, 2020). En condiciones de baja disponibilidad y alta competencia por el agua, se requiere una estrategia integral para mejorar la productividad (García, 2007). Cabe mencionar que el uso y aplicación del agua en la producción de maíz, los volúmenes y tiempos de riego están a criterio de los agricultores, sin bases técnicas que regulen su uso, por lo que se desperdicia, sin prever los tiempos de sequía, en el estado de Sinaloa (Conagua, 2020). En México, el maíz ocupa la mayor superficie cultivada, de 7 a 8.5 millones de ha y la mayoría (85 %) en condiciones de temporal y solo el 15 % restante con riego por gravedad. Sinaloa es el principal productor de maíz con riego (65% de la producción nacional) durante el ciclo otoño-invierno. México a pesar de ser un país maicero, enfrenta un grave problema de autosuficiencia de maíz (Ojeda-Bustamante *et al.*, 2006; López *et al.*, 2001). Pero se requieren enfoques innovadores para ayudar a los agricultores a manejar sus escasos recursos de agua y nutrientes en los campos de cultivo, que ofrez-

can los mejores rendimientos, (Shahzad *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). Los cultivos de cereales contribuyen con el 40 % de los componentes de energía y proteínas en la dieta humana y su cultivo cubre alrededor del 70 % de la superficie total agrícola del mundo, de todos los cereales, el maíz es el tercer cultivo más importante; además, se usa para producir biocombustibles (Shahzad *et al.*, 2017). La aplicación de aditivos orgánicos (soca de maíz procesada con pirolisis) tiene un efecto positivo en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, debido al alto contenido de macro nutrientes (nitrógeno, fósforo, calcio y azufre), micronutrientes (hierro, cobre y zinc) y microorganismos benéficos (Głąb *et al.*, 2018). Los abonos orgánicos se recomiendan en tierras sometidas a la agricultura intensiva para mejorar la estructura del suelo; con ello, se aumentan la capacidad de retención de agua y la disponibilidad de nutrientes para las plantas (López *et al.*, 2001). La aplicación a largo plazo de fertilizantes orgánicos y químicos combinados puede estabilizar el rendimiento del cultivo y hacerlo más sostenible mejorando las propiedades del suelo (Li *et al.*, 2018). El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto hidrodinámico que tiene la aplicación de un aditivo orgánico sobre la retención de humedad en el suelo y su impacto en el rendimiento de grano de maíz y en la eficiencia de uso del agua durante el ciclo otoño-invierno 2018-2019 en Guasave, Sinaloa, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el campo experimental agrícola del Instituto Tecnológico Superior de Guasave, Sinaloa (ITSG), apoyado por los laboratorios de Biotecnología Agrícola del Instituto Politécnico Nacional (IPN) unidad Guasave, Sinaloa, con ubicación geográfica 25° 58' latitud norte, 108° 52' longitud oeste, 220 msnm. El área específica de la comunidad el Burrión, ubicada al sur de Guasave en el distrito de riego 063 a un costado de la carretera México 15. Guasave, Sinaloa, México, es una región agrícola de gran importancia llamada también "Corazón agrícola de México" (Conagua, 2020). Los suelos de la región de Guasave son planos en su mayoría, con una textura predominantemente franco arcillosa (60% limo, 20% arcilla y 10% arena), una densidad aparente de 1.1 g·cm⁻³, y una humedad aprovechable volumétrica alrededor del 16 % (Conagua, 2020). De acuerdo a las estadísticas, Sinaloa es el que aporta mayor producción de granos a nuestro país, pero el que más agua utiliza en siembras de maíz y otros cultivos (Conagua, 2020).

Diseño experimental

Se evaluaron tres tratamientos con dos dosis de un aditivo Orgánico, T-1 = Suelo normal, T-2 = Suelo + 250 kg aditivo orgánico/ha-1, T-3 = Suelo + 500 kg aditivo orgánico/ha-1, con tres repeticiones, en un espacio de 30 x 90 m². Los materiales manualmente, posteriormente fueron incorporados y homogenizados con equipo de barbecho y rastreo, a una profundidad de 30 cm, que corresponden a 2.5 y 5 t·ha-1, con un costo de \$2,000.00 x tonelada, se niveló



Figura 1. Ubicación de los tratamientos estudiados en el cultivo de maíz en el ciclo otoño-invierno de 2019-2020 en el campo experimental del Instituto Tecnológico Superior de Guasave (ITSG).

Figure 1. Location of the treatments studied in the corn crop in the autumn-winter cycle of 2019-2020 in the experimental field of the Higher Technological Institute of Guasave (ITSG).

el suelo a 10 cm de pendiente con equipo automatizado (GPS). Se marcaron los surcos, se fertilizó y se realizaron sus respectivos canales de alimentación y drenaje de agua; los equipos utilizados fueron: rastra, arado de discos, canalera, aspersores, sembradora de precisión, equipo de fertilización cultivo y tractor marca John Deere.

Propiedades físicas y químicas de los suelos

Se determinaron las propiedades físicas del suelo de los tres tratamientos, la Textura (Método de Day) (Buol *et al.*, 1997), Ph, Conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), Densidad aparente (ρ_a), Densidad real (ρ_b), Porosidad total (ψ), Infiltración acumulada (f) y Tasa de infiltración (F) (Laboratorio de Física de suelos de la Universidad Autónoma de Chapingo) y aplicando el modelo de Green y Ampt (Prado *et al.*, 2017) Se determinaron las curvas de infiltración de humedad según Green y Ampt (1911) y Prado *et al.* (2017), con la finalidad de predecir lamina (cm) y tiempos de riego (h) en el suelo utilizado.

Se realizó un análisis químico (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu y Na) a los tres tratamientos en el laboratorio de fertilidad del Instituto Politécnico Nacional (IPN) unidad Guasave, para definir la dosis de fertilización.

Elaboración de aditivo orgánico

Se recolectaron materiales secos de maíz, biomasa agrícola, en predios de agricultores en Burrión, Guasave Sinaloa. Posteriormente se trituraron (polvo), proceso de secado del cual se introdujeron en un equipo cerrado en ausencia de oxígeno, aplicando temperaturas de 300 °C, con la finalidad de obtener carbonos (C), utilizados como aditivos orgánicos retenedores de humedad en suelos agrícolas, el equipo cuenta con una salida para liberar oxígeno (O), hidrógeno (H) y alquitranes (ligninas y pectinas), materiales de los que está conformado la soca de maíz. La pirolisis es uno de los procesos más utilizados para separar los carbonos existentes en materiales orgánicos (celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina) en la que se aplica temperatura en ausencia

de oxígeno, dichas sustancias orgánicas pueden ser utilizadas como retenedores de humedad y elementos químicos del agua (Hernández *et al.*, 2012).

Fertilización

La fórmula de fertilización que se aplicó fue de 400-100-00 de N-P2O5-K2O, respectivamente. Antes y después del riego se tomaron lecturas de humedad gravimétrica con la finalidad de realizar la siembra a Capacidad de Campo (CC), se sembró maíz variedad Asgrow Caribou, el 15 de noviembre de 2019 y se cosechó el 17 de mayo del 2020 con una humedad de grano de 14.7%. La densidad de siembra fue de 128,000 plantas·ha⁻¹ con un espaciamiento entre plantas de 10-12 cm y una separación entre surcos de 0.75 m. La densidad óptima de siembra para tener un efecto positivo en los componentes del rendimiento y la mayor producción de maíz en la franja maicera de Estados Unidos (Jia *et al.*, 2017). Los cambios en la fecha de siembra del maíz alteran la tasa de crecimiento del cultivo y la duración de las fases fenológicas, lo que, a su vez, modifica el rendimiento del grano y sus componentes (Bonelli *et al.*, 2016).

Aplicación de riegos

La aplicación del riego se llevó a cabo de acuerdo a las curvas de tensión de humedad, se tomó muestra del suelo y se mesclo con el aditivo, generadas en el laboratorio de física de suelos de la Universidad Autónoma de Chapingo de los tres tratamientos, realizando una aforación para determinar la cantidad de agua aplicada a los tratamientos (1200 L/h). Se calcularon los intervalos de riego mínimo y máximo (días), cantidad de riegos y caudal aplicado (Prado *et al.*, 2017). Se midió la humedad volumétrica, antes y después del riego, con un equipo TDR-300 (Marca HANNA) calibrado con agua destilada, calculado de acuerdo a la evapotranspiración del periodo de cultivo (Blaney y Criddle, 1950), método usado extensivamente en los más de 130 distritos de riego de México. Lo ideal en el riego por gravedad a nivel parcelario es que todas las plantas reciban la misma cantidad de agua, lo cual equivale a una aplicación uniforme de la lámina de riego en toda la longitud del surco (Christiansen, 1942). Se realizaron evaluaciones de eficiencia de aplicación y distribución mediante aforo de sifones y mediciones de la humedad del suelo, se utilizó una pala (Azteca), sifones de hule de 1/2 pulgada de ancho y hules negros como compuertas. Se obtuvieron datos del gasto de agua (L) y producción en (kg); se establecieron mediciones cada 5 m, analizando 3 muestras de cada punto (0, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 m) en cada tratamiento; todas las muestras fueron tomadas en forma aleatoria de la parte central, a partir de 2 m de la orilla del predio. Para medir estas variables se utilizaron cintas (marca Briyte), balanza granataria (Marca Hanna), rodillos para desgranar mazorca, recipientes de plástico para recolección de grano y bolsas transparentes para recolección de mazorca. Para el control de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) se aplicó Sevin G a los 30 días de crecimiento con equipo de aspersión.

Análisis estadísticos (ANOVA)

En la producción final de maíz se analizó en forma individual aplicando un ANOVA y la prueba de medias Tukey. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa R-Project 2.14.2 (Core Team, 2018).

Condiciones climatológicas

El promedio de las condiciones climatológicas tales como evapotranspiración humedad relativa (55 %), evaporación (6 mm) y temperaturas mínimas (16 °C) y máximas (41 °C) se tomaron desde la central de información de la Asociación de Agricultores Rio Poniente (AARP). Los principales factores climáticos que influyen en el crecimiento del maíz son la temperatura y lluvia, las cuales durante la temporada de cultivo estuvieron dentro del rango requerido para su crecimiento y desarrollo, en el caso de la temperatura, el umbral mínimo requerido para el crecimiento del maíz es 10 °C Djaman *et al.* (2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aporte de materia orgánica y la rotación de cultivos, aumenta la producción de maíz, ya que puede mejorar las características químicas y físicas del suelo, aumenta la fertilidad y puede aumentar la retención de humedad (Sun, 2018), del cual las plantas que se desarrollan en suelos ricos de materia orgánica, mantienen un equilibrio en su estructura fisiológica provocando una resistencia a plagas y enfermedades.

Tabla 1. Características físicas y químicas del suelo con diferentes dosis de aditivo orgánico en Guasave, Sinaloa, México.

Table 1. Physical and chemical characteristics of the soil with different doses of organic additive in Guasave, Sinaloa, Mexico.

Características Químicas	Símbolo	T1	T2	T3
Nitrógeno (ppm)	N-NO3	25	25	24
Fosforo (Olsen (mg/kg))	P	11.6	11.6	11.6
Potasio (Cmol/kg)	K	2.97	2.98	2.98
Magnesio (Cmol/kg)	Mg	9.2	9.18	9.2
Cobre (Cmol/Kg)	Cu	0.4	0.5	0.4
Calcio (Cmol/Kg)	Ca	19.3	19.3	19.3
Sodio (Cmol/Kg)	Na	0.7	0.7	0.7
Cond. eléctrica (mmhos/cm)	CE	1.07	1.08	1.08
Hierro (Cmol/Kg)	Fe	0.5	0.5	0.5
Características Físicas				
Materia orgánica (%)	MO	1.1	1.22	1.3
Textura	T	F-A	F-A	F-A
Potencial de hidrógeno	pH	7.8	7.6	7.8
Densidad aparente (g-cm-3)	ρ_b	1.57	1.11	1.02
Densidad real (g-cm-3)	ρ_s	2.63	2.61	2.65
Porosidad total (cm)	Ψ	0.4	0.58	0.61
Infiltración acumulada (cm)	F	6	12	15

Testigo (T1), Tratamiento 2 (T2), Tratamiento 3 (T3) y F-A = Franco Arcilloso

En la Tabla 1 se muestran las características químicas y físicas, relacionadas con el suelo franco arcillosos donde los macro y micronutrientes son muy similares en T2 y T3, con respecto al testigo T1, pero en las propiedades físicas como la porosidad total (Ψ), densidad aparente (ρ_b), densidad real (ρ_a), materia orgánica (MO) y su infiltración acumulada (F), si existen diferencias significativas, es por ello el mejoramiento de suelos. El incremento en retención de humedad en los suelos tiene efectos benéficos para las plantas, ya que reduce el estrés hídrico durante el crecimiento (Su *et al.*, 2007). Además de aumentar la retención de humedad, la aplicación de aditivos orgánicos mejoró otras propiedades físicas del suelo; la materia orgánica se incrementó y la densidad aparente disminuyó, lo que explica el aumento en la porosidad y en la infiltración acumulada. Según Chun *et al.*, (2017), la aplicación de materia orgánica en suelos con labranza convencional incrementa la formación de agregados, mejorando la estructura del mismo. En las propiedades químicas evaluadas, no se observaron efectos en la disponibilidad de N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe y Cu.

Tabla 2. Intervalos mínimos y máximos, número riegos y caudal aplicado, calculados en laboratorio para aplicación en suelos con diferentes dosis de aditivo orgánico.

Table 2. Minimum and maximum intervals, number of irrigations and applied flow, calculated in the laboratory for application in soils with different doses of organic additive

Tratamientos	Intervalos de riego (días)			Caudal (L)
	Mínimo	Máximo	Número de riegos	
1	13	20	5	18,000
2	17	26	4	14,400
3	17	26	4	14,400

T-1= Suelos normal, T-2 = Suelo+250 kg de aditivo orgánico/ha, T-3=Suelo + 500 kg de aditivo orgánico/ha.

En la Tabla 2 se aprecia que los días mínimos y máximos de riego son mayores en los T2 y T3 con relación al testigo T1, esto indica que la humedad es mayor y ayudaría a los agricultores a disminuir un riego menos en sus cultivos, al igual a los módulos de riego su ahorro de líquido vital, los días de riego se ampliarían: testigo T1 (1, 55, 80, 110 y 130 días), T2 (1, 60, 90 y 120 días), T3 (1, 65, 95 y 125 días). Estos estudios indican que es posible aplicar técnicas de retención de humedad en riego por gravedad para el suelo franco-arcilloso, que es predominante en la zona de Guasave, Sinaloa; es posible aplicar aditivos orgánicos y reducir el proceso de percolación y tener una mayor retención de humedad. Opatokun *et al.* (2017) Menciona que cada agricultor recibe un volumen de agua de acuerdo con el área de propiedad, sin tener en cuenta el tipo de cultivo y su requerimiento de agua, incluso si algunas parcelas no se explotan de acuerdo a las fechas de siembra, el tamaño de las parcelas y la cantidad de nitrógeno utilizado, sin importar el tiempo de riego. Las fechas de siembra son de suma importancia para fortalecer la producción (Jiménez *et al.*, 2020).

Retención de humedad

El riego es la única forma de reducir el estrés hídrico de los cultivos y mantener las plantas con la humedad óptima para su crecimiento (Ojeda-Bustamante *et al.*, 2006). En la figura 2, se aprecia la retención de humedad, de acuerdo a la gráfica, es mayor la retención en T2 y T3 con respecto a testigo T1. De acuerdo a la cultura de los agricultores en Sinaloa, algunos aplican cantidades demasiado altas y otros demasiado bajas de agua en sus cultivos, lo que se debe a la falta de información del riego por gravedad, en los centros de investigación en la zona de Guasave, Sinaloa (García, 2007). Existen muchos métodos para medir la humedad del suelo, como el modelo de Richards y Kostikov, pero son modelos complicados y de alto costo de operación (Prado *et al.*, 2017). En esta investigación se aplicó el modelo de Green y Ampt (1911), modelo físico que, de acuerdo a parámetros obtenidos en laboratorio, puede predecir la lámina de riego (cm) y obtener el gasto de agua y tiempo en que debe aplicarse de forma precisa (Prado *et al.*, 2017). La aplicación de aditivos orgánicos puede disminuir los tiempos de riego, ya que mejoran la retención del agua y algunas propiedades físicas del suelo, los polímeros súper adsorbentes (SAP) han sido desarrollados y utilizados como acondicionadores de humedad del suelo, como agentes de inmersión de raíces y semillas o como materiales de recubrimiento en la agricultura y la silvicultura; son materiales elaborados de biomasa seca, ricos en polímeros naturales, elaborados por pirólisis, utilizados para retener nutrientes y humedad en los predios agrícolas en China (Chen *et al.*, 2017).

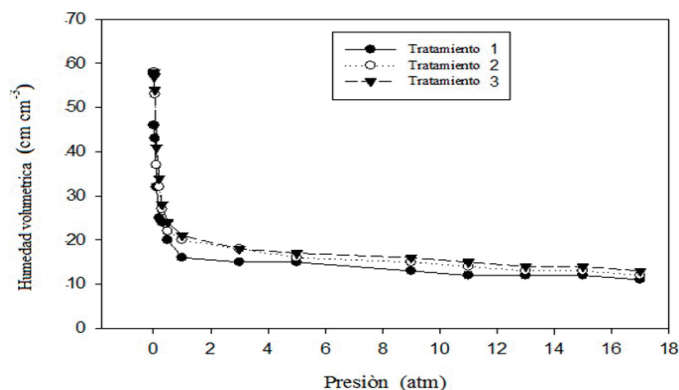


Figura 2. Curvas de tensión de humedad en suelo con diferente dosis de aditivo orgánico en Guasave, Sinaloa, México. Testigo= Suelos normal, T-2 = Suelo+25g de aditivo orgánico/kg de suelo, T-3=Suelo + 50g de aditivo orgánico/kg de suelo.

Figure 2. Moisture tension curves in soil with different doses of organic additive in Guasave, Sinaloa, Mexico. T-1 = normal soils, T-2 = Soil + 25g of organic additive / kg of soil, T-3 = Soil + 50g of organic additive / kg of soil.

Producción y gasto de agua

Se puede apreciar en la figura 3, que la producción es muy similar en los tres tratamientos, dando una producción: testigo T1= 17.9 t/ha⁻¹, T2= 17.5 t/ha⁻¹ y T3= 18.1 ton/ha de maíz, con un gasto de agua menor en los tratamientos T2 (4 riegos) y T3 (4 riegos) con respecto al testigo T1 (5 riegos), con una duración de 3 horas cada riego, con un gasto de

agua (tabla 2) de 1200 l/h, dando como gasto de agua/kg de maíz: T1= 18000 l/17900 kg de maíz, T2=14400 l/17500 kg de maíz y T3=14400 l/18100 kg, donde para producir un kilogramo de maíz se requiere en T1=1.005 litros de agua, T2= .82 litros de agua y T3= .79 litros de agua, es por ello que la incorporación de materiales orgánicos aumentan la retención de agua en los predios agrícolas, el mejor tratamiento retenedor de humedad y productor de maíz fue el T3, con respecto al testigo T1. Es importante aumentar la eficiencia del uso del agua (litros de agua por kilogramos de maíz producido), lo que podría lograrse con la aplicación de aditivos orgánicos, por lo que es un reto para la investigación, la producción de aditivos orgánicos elaborados con biomasa agrícola procesada por pirolisis (Opatokum, 2017). Se ha establecido que el maíz es más susceptible al estrés hídrico durante la etapa reproductiva, ya que se ha demostrado su mayor impacto en formación y llenado de grano (Doorenbos y Kassam, 1979).

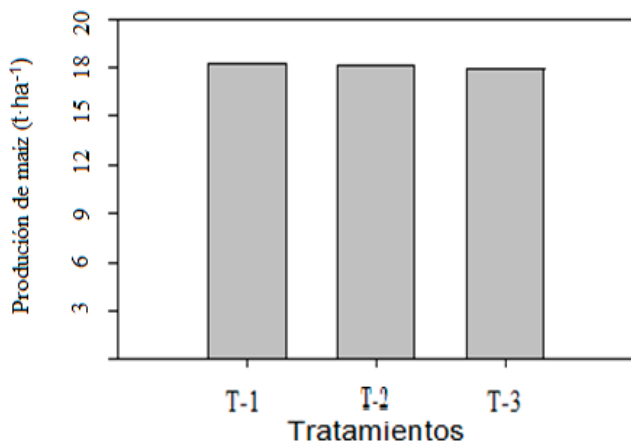


Figura 3. Efectos en la producción de grano en suelo franco arcilloso de diferentes dosis de aditivo orgánico en Guasave, Sinaloa, México. Testigo 1 = Suelo normal, T-2 = Suelo + 25g aditivo orgánico/kg de suelo, T-3 = Suelo + 50g aditivo orgánico/kg de suelo.

Figura 3. Effects on grain production in clay loam soil of different doses of organic additive in Guasave, Sinaloa, Mexico. T-1 = Normal soil, T-2 = Soil + 25g organic additive / kg of soil, T-3 = Soil + 50g organic additive / kg of soil

ANOVA

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) entre los promedios de los tratamientos en gasto de agua para producir un kilogramo de maíz, con respecto al testigo y numéricamente T1=1.005 litros de agua para producir 1 kg de maíz, T1=1.005 litros de agua para producir 1 kg de maíz y T3=.80 litros de agua para producir 1 kg de maíz el 40 % de ahorro de agua T1=T3, es numéricamente mayor T3.

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) de la producción de maíz entre tratamientos con diferente dosis de aditivo orgánico.

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of the production of dry corn between treatments with different doses of organic additive.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.66	2	1.33	9.37	0.000978044	3.40
Dentro de los grupos	3.41	24	0.14			
Total	6.07	26				

En la producción de maíz se observó un mejor rendimiento en los tratamientos T-2 y T-3 que en el tratamiento T-1. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T-1 y T-2, pero entre T1 Y T3 si existe diferencia significativa y numéricamente se observó un mejor resultado en el tratamiento T-3.

CONCLUSIONES

La aplicación de aditivos orgánicos aumentó efecto en la retención de humedad en el suelo y permitió ampliar los días de riego por gravedad hasta un 30%, en relación a un suelo sin aditivo orgánico. La aplicación de aditivos orgánicos aumento la producción de maíz en T3 y aumento la eficiencia de uso del agua en un 40 %. La humedad aprovechable (HA) varió por la cantidad de aditivos orgánicos aplicado que estuvo asociada a un incremento de la materia orgánica del suelo. Ambas variables explicaron 30.8% la variación de la HA, donde este fenómeno explica que con menos agua o tiempo de riego se puede aumentar la producción de maíz en un 5 %. Con base en los resultados obtenidos la aplicación de aditivos orgánicos, sería de gran utilidad en el ahorro de agua y evitar la escasez del vital líquido en los mantos acuíferos, evitando sequias a largo plazo, además de reducir costos en la producción de maíz y otros cultivos.

REFERENCIAS

- Blaney, H. F y Criddle, W. D. 1950. Determining water needs from climatological data. United States Department of Agriculture. Soil Conservation Service. 4: 8-9.
- Bonelli, L. E., Monzon, J. P., Cerrudo, A., Rizzalli, R. H. y Andrade, F. H. 2016. Maize grain yield components and source-sink relationship as affected by the delay in sowing date. *Field Crops Research*. 198: 215-225.
- Christiansen, J. E. 1942. Irrigation by sprinkling. University of California Agricultural Experiment Station Bulletin. 670, 124.
- Chen, X., Huang L., Mao X., Liao Z. y He, Z. 2017. A comparative study of the cellular microscopic characteristics and mechanisms of maize seedling damage from superabsorbent polymers. *Pedosphere*. 27(2): 274-282.
- Chun, T., Fa-dong, L., Yun-feng, Q. y Nong, Z. 2017. Effect of experimental warming on soil respiration under conventional tillage and no-tillage farmland in the North China Plain. *Journal of Integrative Agricultura*. 16(4): 967-979.
- Comisión Nacional del Agua - Conagua, 2020. Estadísticas agrícolas de hidrométrica y producción granos maíz, sorgo, frijol y garbanzo de la República Mexicana. [Consultado el 31 de Diciembre 2021] 2020. /http://www.edistritos.com/DR/estadisticaAgricola/cultivo.php.
- Core Team R. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna. Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>.
- Djaman, K., Irmak, S., Rathje, W.R., Martin, D.L. y Eisenhauer, D.E., 2013. Maize evapotranspiration, yield production functions, biomass, grain yield, harvest index, and yield response factors under full and limited irrigation. *Agriculture Biology Enginery*. 56: 273-293.

- Doorenbos, J. y Kassam, A.H. 1979. Yield response to water. Irrigation and drainage, paper No. 33. Rome, Agricultural Sciences. 3: 35-40.
- García, V. 2007. Water infiltration and flow measuring of streams in la sierra de Quila. *Agrociencias*. 2: 1125-1132.
- Głąb, T., Żabiński, A., Sadowska, U., Gondek, K., Kopeć, M., Mierzwa-Hersztek, M. y Tabor, S. 2018. Effects of co-composted maize, sewage sludge, and biochar mixtures on hydrological and physical qualities of sandy soil. *Geoderma*. 315: 27-35.
- Green, W.H. y Ampt, G. 1911. Study in soil physics. I. The flow of air and water through soils. *The Journal of Agriculture Science*. 4: 1-24.
- Hernández M. V. 2012. Caracterización de aditivo carbonaceo para extracción de fluoruros de agua con material orgánico aplicando pirolisis. *Revista de Ingeniería y Tecnología*. 2: 23-25.
- Jia, Q., Sun, L., Mou, H., Ali, S., Liu, D., Jai Y. y Zhang, Z. 2017. Effects of planting patterns and sowing densities on grain-filling, radiation use efficiency and yield of maize (*Zea mays* L.) in semi-arid regions. *Agricultural Water Management*. 201(31): 287-298.
- Jiménez L. J., Agustín R. C., Jesús L. E. y Alfonso S. V. 2020. Effect of variety and seedtime on the productive potential of sugar beet. *Biotecnia*. 22(3): 5-10.
- Li, C., Ma, S., Shao, Y., Ma, S., y Zhang, I. 2018. Effects of long-term organic fertilization on soil microbiologic characteristics, yield and sustainable production of winter wheat. *Journal of Integrative Agriculture*. 17(1): 210-219.
- López, M. J. D., Díaz, E. A., Martínez, R. E. y Valdez, C. R. 2001. Abonos orgánicos y su efecto en propiedades físicas y químicas del suelo y rendimiento en maíz. *Terra Latinoamericana*. 19(4): 293-299.
- Montoya-Rodríguez A., Osuna-Gallardo E., Cabrera-Chavez F., Milan-Carrillo J., Reyes-Moreno C., Milan-Noris E. M., Cuevas-Rodríguez E. O., y Mora-Rochín S. 2020. Evaluation of the in vitro and in vivo antihypertensive effect and antioxidant activity of blue corn hydrolysates derived from wet-milling. *Biotecnia*. 22(2): 155-162.
- Opatokun, S. A. 2017. Agronomic assessment of pyrolysed food waste digestate for sandy. *Journal of Environmental Management*. 187: 24-30.
- Ojeda-Bustamante, W., Sifuentes-Ibarra E. y Unland-Weiss, H. 2006. Programación integral del riego en maíz en el norte de Sinaloa, México. *Agrociencia*. 40(1): 13-25.
- Prado H. J. V., Ramírez P. F., Acevedo C. D., García C.M., Hernández S.F.R., Martínez. R. A. 2017. Evaluation of Green and Ampt infiltration equation in some agricultural soils in México using USDA information and a modifield method from Brooks and Corey. *Interciencia*. 2: 23-34.
- Shahzad, S. M., Arif, M. S., Riaz, M., Ashraf, M., Yasmeen, T., Zaheer, A. y Robroek, B. J. M. 2017. Interaction of compost additives with phosphate solubilizing rhizobacteria improved maize production and soil biochemical properties under dryland agriculture. *Soil and Tillage Research*. 174: 70-80.
- Su, Z., Zhang, J., Wu, W., Cai, D., Lv, J., Jiang, G., Huang, J., Gao, J., Hartmann, R., Gabriels, D., 2007. Effects of conservation tillage practices on winter wheat water-use efficiency and crop yield on the Loess Plateau. *China. Agriculture Water Management*. 87: 307-314.
- Sun, Z. L. 2018. Effects of alfalfa intercropping on crop yield, water use efficiency, and overall economic benefit in the Corn Belt of Northeast China. *Field Crops Research*. 34: 405-490.

Leche cruda de vaca destinada a la elaboración de productos artesanales: calidad microbiológica y fisicoquímica

Raw cow's milk used for the production of artisanal products: microbiological and physicochemical quality

Iñiguez-Muñoz LE¹, Valencia-Botín AJ², Anaya-Esparza LM³, Anzaldo-Ortega RE¹, Pliego-Sandoval JE¹, Reyes-Nava LA¹, Méndez-Robles MD^{3*}

¹ División de Ciencias Exactas, Naturales y Tecnológicas. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. Av. Enrique Arreola Silva No. 883, Colón, Cd Guzmán Centro, C.P. 49000. Cd Guzmán, Jalisco.

² División de Desarrollo Biotecnológico. Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara. Av. Universidad N° 1115, Col. Lindavista, C.P. 47820. Ocotlán, Jalisco.

³ División de Ciencias Agropecuarias. Centro Universitario de los Altos. Universidad de Guadalajara. Av. Rafael Casillas Aceves No. 1200, C.P. 47600. Tepatlán de Morelos, Jalisco.

RESUMEN

La leche cruda de vaca se utiliza como materia prima sin pasteurizar para elaborar productos artesanales; sin embargo, es necesario analizar su calidad antes de la transformación al producto final. El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad de leche cruda utilizada para elaborar productos artesanales respecto a los límites fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en la normatividad mexicana. Los factores de estudio fueron tipo de ordeño y tratamiento post-ordeño que recibe la leche. El análisis de la calidad de las muestras recolectadas se efectuó acorde a metodologías oficiales. Respecto a la calidad microbiológica, los resultados demostraron que la mayoría de las muestras no cumplen con los criterios establecidos para células somáticas (80 %), bacterias mesofílicas (90 %) y organismos coliformes totales (83 %). Contrariamente, los resultados del análisis fisicoquímico de la leche mostraron que el contenido de proteína, grasa, lactosa y sólidos no grasos cumplen con las especificaciones que dicta la normatividad (91 %, 80 %, 96 % y 93 % de las muestras respectivamente). Los resultados reflejaron la mala calidad microbiológica de la leche utilizada para la elaboración de productos artesanales; siendo esto la consecuencia de prácticas higiénicas deficientes que repercuten en el producto final.

Palabras clave: Leche cruda, productos artesanales, normatividad, calidad microbiológica y fisicoquímica.

ABSTRACT

Raw cow's milk is widely used as an unpasteurized raw material for artisanal products; however, it is necessary to analyze its quality before obtaining the final product. Thus, the objective of this study was to evaluate the quality of raw milk used to produce artisanal products with regard to the physicochemical and microbiological limits established in Mexican regulations. The factors studied were the milking method and post-milking treatment used to assure milk quality. All analyses of the collected samples were carried out according to the official methodologies. Regarding microbiological criteria, the results showed that the majority of

the samples do not meet the established criteria for somatic cells (80%), mesophilic bacteria (90%), and total coliform organisms (83%). Conversely, the physicochemical analysis of milk samples showed that the content of protein, fat, lactose, and non-fatty solids met the specifications stipulated by national regulations (91%, 80%, 96%, and 93%, respectively). In general, results reflected the poor microbiological quality of the milk used for artisanal products; this being the consequence of poor hygienic practices, impacting the final product quality.

Keywords: Raw milk, artisanal products, regulation, microbiological and physicochemical quality

INTRODUCCIÓN

La leche cruda de vaca y sus derivados son considerados productos de necesidad básica en la alimentación humana (FAO, 2011; Martínez-Vasallo *et al.*, 2017). Al ser utilizada como materia prima para la elaboración de productos artesanales como yogur, queso, crema, helado, mantequilla y dulces (Álvarez-Fuentes *et al.*, 2012), la leche debe de cumplir con las disposiciones y especificaciones sanitarias que establece la normatividad mexicana vigente (NOM-092-SSA1-1994, NOM-243-SSA1-2010, NMX-F-700-COFOCALEC-2012).

Fuentes-Coto *et al.* (2013) y Ríos-Muñoz *et al.* (2019) afirman que la leche cruda de vaca y sus derivados, proporcionan una fuente de crecimiento de microorganismos asociados a diversos factores; los cuales dependen de las características fisicoquímicas, los estándares higiénicos y aspectos nutricionales. En el mismo sentido, Villoch (2010) lo atribuye a la práctica de cría de animales, la recolección y el procesamiento antihigiénico. La pasteurización es un proceso térmico y convencional que busca conservar las propiedades fisicoquímicas de la leche y evitar el crecimiento de microorganismos patógenos o deterioradores (Chombo-Morales y Ramírez-Cerda, 2017). Por lo que, el no pasteurizar la leche puede ocasionar daños a la salud del consumidor (Lan *et al.*, 2017). En este orden de ideas, la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO, 2018) reafirma que con la finalidad de prolongar la vida útil de la leche es necesario que se pas-

*Autor para correspondencia: María Dolores Méndez Robles
 Correo electrónico: mdmendez@cualtos.udg.mx

Recibido: 6 de diciembre de 2021

Aceptado: 2 de mayo de 2022

teurice, antes de llegar a la mesa del consumidor. El aspecto negativo que se les atribuye a los productos lácteos artesanales es que no son garantes de inocuidad, ya que una buena parte de ellos se elaboran con leche cruda sin pasteurizar; lo anterior, con el propósito de mantener las características organolépticas que los hacen muy preciados en cada región (Villegas de Gante *et al.*, 2016). De acuerdo a Monroy (2018) en México alrededor del 40 % de la leche que se consume, así como sus derivados, no se pasteurizan; por lo tanto, son causantes de Enfermedades de Transmisión de Alimentos [ETA] como brucelosis o tuberculosis. La contaminación con patógenos bacterianos en alimentos lácteos puede presentar un riesgo para la salud pública, lo que genera eventuales brotes de enfermedades (Fox *et al.*, 2019). A pesar de ello, existen consumidores que prefieren productos artesanales con leche no pasteurizada, sin considerar el control de calidad de la materia prima, procesos y productos obtenidos a partir de ella (Villegas de Gante *et al.*, 2016; Licitra *et al.*, 2019).

La calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche se ha estudiado por diversos investigadores, entre ellos Gwandu *et al.* (2018) y Ríos-Muñiz *et al.* (2019) quienes analizaron las características bacteriológicas y fisicoquímicas de la leche cruda de vaca y exhibieron microorganismos indicadores de mala higiene con potencial patógeno como Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y micobacterias; por tanto, su consumo podría ser perjudicial para la salud. En otra investigación realizada en Venezuela, se analizó la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada; en leche cruda, 72.5 % de las muestras se encontraron por encima de los límites para bacterias aerobias mesófilas (2×10^4 UFC/mL), indicando condiciones higiénico-sanitarias deficientes (Luigi *et al.*, 2013).

En México se evaluó la calidad microbiológica de la leche cruda de vaca y el efecto del tiempo de residencia de la leche durante la ordeña (aproximadamente dos horas); se tomaron muestras al inicio y al final de la ordeña y se encontró que en el 80 % de estas hubo un aumento significativo de microorganismos. El promedio de aumento de mohos y levaduras fue de 300 %, mientras que *Salmonella* y *Shigella* fueron el conteo que individualmente alcanzó mayor aumento (1000 %) (Rojas-Ronquillo *et al.*, 2014). En el estado de Hidalgo se comparó la calidad sanitaria y fisicoquímica en 1416 muestras de la leche producida en tres cuencas; los resultados sobre el Conteo de Células Somáticas (CCS) demostró que la leche fue de mala calidad, tanto en México como en el ámbito internacional; contrariamente, el valor de sólidos no grasos indicó que la leche es de buena calidad desde el punto de vista fisicoquímico (Cervantes *et al.*, 2013). Por otro lado, Fuentes-Coto *et al.* (2013) evaluó la calidad e inocuidad de la leche cruda, el conteo de BMA alcanzó 135×10^6 UFC/mL y de coliformes 150×10^6 NMP/mL en el tanque de almacenamiento, valores por encima del límite permitido por la NOM-243-SSA1-210 para leche (100 UFC/g de no patógenos); adicionalmente, se identificó *E. coli* y *S. aureus* en leche bronca que no deben estar presentes de acuerdo a

la norma. En el mismo trabajo se evaluó la temperatura, pH, densidad y alcohol; cuyos valores se encontraron en el intervalo normal de la prueba.

En cuanto a la calidad fisicoquímica, los productores lácteos buscan leche con altos contenidos de sólidos totales, en donde destaque el porcentaje de proteína total (dentro de ella la caseína) y la grasa butírica, ya que son indicadores que infieren alto valor industrial (Villegas de Gante *et al.*, 2016); existe una correlación positiva entre los porcentajes de grasa y proteína de la leche con el rendimiento de queso y otros productos lácteos (Mejía-López *et al.*, 2017).

De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2021), la producción nacional de leche de bovino fue de 12 mil 554 millones de litros en el año 2020. Jalisco es el principal productor con dos mil 626 millones de litros, lo que representa el 21 % del total nacional; mientras que el municipio de Tepatlán de Morelos es el mayor productor estatal del lácteo desde 2018 con un aporte de 370 mil litros, lo que equivale al 14 %. Tomando en cuenta lo anterior, se planteó el objetivo de determinar la calidad de la leche cruda de este municipio, la cual es utilizada para la elaboración de productos artesanales con respecto a los límites fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en la normatividad mexicana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Se realizó un muestreo no probabilístico aleatorio, seleccionando 100 productores de leche cruda de vaca, de localidades del municipio de Tepatlán de Morelos, Jalisco. Fueron recolectadas en la recepción de una cooperativa de productos lácteos artesanales (200 mL en frasco estéril) siguiendo las recomendaciones de la NOM-109-SSA1-1994. Las muestras se trasladaron conservando la cadena de frío (4°C) al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento de Ciencias Pecuarias y Agrícolas del Centro Universitario de los Altos (CUAltos) de la Universidad de Guadalajara.

Análisis microbiológico

El CCS se realizó con el equipo NucleoCounter SCC-100 (Astori Técnica®, Italia), siguiendo las instrucciones del fabricante, cuyo intervalo de mediciones es de 10 000 a 2 000 000 CCS/mL. La preparación y dilución de las muestras para conteos microbiológicos se realizó según indicaciones de la NOM-110-SSA1-1994. Las metodologías aplicadas para la determinación de BMA, mohos y levaduras se llevaron a cabo de acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010; por su parte, los organismos coliformes totales (OCT), *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. fueron identificados mediante los apéndices H, B y A respectivamente, como lo establece la NOM-210-SSA1-2014.

Análisis fisicoquímicos

El contenido de grasa, proteína, caseína, lactosa, sólidos totales, sólidos no grasos y punto crioscópico se cuan-

tificó por duplicado en todas las muestras con un equipo MilkoScanTM (Foss, FT 120, tipo 71200, Hillerod, Dinamarca). Previó al análisis de la muestra el equipo se acondicionó siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación de la muestra (50 mL) consistió en calentar la leche a 40 °C en un baño de agua, seguido de un enfriamiento a 20 °C.

Análisis estadísticos

Los factores de estudio fueron el ordeño, el cual podía ser manual o mecánico y el tratamiento, considerando si la leche es transportada y entregada fría (4 °C) o caliente (temperatura ambiente) a la empresa. Las variables microbiológicas fueron transformadas a Log10 para su análisis estadístico. Se comprobó normalidad y homogeneidad de varianza en todas las variables, las cuales mostraron distribución normal con un valor $P > 0.01$ utilizando la prueba de Anderson-Darling. Fue requerida la transformación Johnson para tratar los datos de las variables grasa, proteína, lactosa, punto crioscópico, ácidos grasos libres y levaduras. Posteriormente se realizó un ANOVA simple sobre las variables fisicoquímicas y microbiológicas con los factores estudiados (ordeño y tratamiento) comparadas con un valor $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológico

Las características nutricionales de la leche, el contenido de agua y pH cercano a la neutralidad, hacen de este alimento un sustrato ideal para el desarrollo de microorganismos (Gómez y Mejía, 2005; Quigley *et al.*, 2011). En este contexto, el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus derivados (COFOCALEC) propuso una clasificación aplicable para determinar el grado de cumplimiento de calidad en leche cruda de vaca destinada a la fabricación e industrialización de productos para consumo humano (NMX-F-700-COFOCALEC-2012). En la Tabla 1 se muestran los resultados de CCS y BMA comparando contra los criterios que establece COFOCALEC; en lo referente al CCS, la mayoría de las muestras se clasificaron como clase 4 y superior ($>7.5 \times 10^5$ CCS/mL); lo cual representa el 37.9 % de las muestras de leche fría y el 59.1 % de leche caliente. Por otra parte, solo el 20.69 % de leche fría y el 19.72 % de caliente se clasificaron como clase uno ($\leq 4 \times 10^5$ CCS/mL). A pesar de las diferencias matemáticas, no se encontraron diferencias significativas de esta variable respecto a los factores ordeño y tratamiento (ver Tabla 2). De acuerdo con la norma NMX-F-700-COFOCALEC-2012 solo la leche clasificada como clase 1 se debería de utilizar en la producción de alimentos para consumo humano, ya que conteos elevados de CS afectan negativamente a la producción y composición de la leche (Citalan *et al.*, 2016). Resultados similares fueron observados en siete regiones representativas de Puno, Perú (Brousett-Minaya *et al.*, 2015), en dicho trabajo se concluyó que las inadecuadas prácticas de ordeño provocan problemas de mastitis en el ganado, lo que influye en la calidad e inocuidad de la leche.

En lo concerniente a las BMA, la mayoría de las muestras se clasifican dentro de la clase cuatro o superior ($>6 \times 10^5$

Tabla 1. Cumplimiento de especificaciones sanitarias para leche cruda de vaca de células somáticas y bacterias mesófilas, respecto al factor tratamiento.

Table 1. Raw cow's milk compliance with regulatory specifications for somatic cells and mesophilic bacteria, regarding the treatment factor.

Parámetro/ Cumplimiento	CCS (células/mL) Límite*	Resultados Células somáticas (%)	
		Fría	Caliente
Clase 1	$\leq 400,000$	6*** (20.69)	14 (19.72)
Clase 2	401,000-500,000	2 (6.90)	2 (2.82)
Clase 3	501,000-749,000	10 (34.48)	13 (18.31)
Clase 4	750,000-1,000,000	5 (17.24)	15 (21.13)
>Clase 4	$>1,000,000$	6 (20.69)	27 (38.03)
Parámetro/ Cumplimiento	BMA (UFC/mL)**	Bacterias mesófilas (%)	
		Fría	Caliente
Clase 1	$\leq 100,000$	8 (27.59)	2 (2.82)
Clase 2	101,000-300,000	8 (27.59)	6 (8.45)
Clase 3	301,000-599,000	0 (0)	2 (2.82)
Clase 4	600,000-1,200,000	3 (10.34)	3 (4.23)
>Clase 4	$>1,200,000$	10 (34.48)	58 (81.69)

Fuente: *NOM-092-SSA1-1994 y **NMX-F-700-COFOCALEC-2012. *** Número de productores se muestra fuera del paréntesis. Abreviaciones; CCS: Conteo de células somáticas y BMA: Bacterias mesófilas aerobias.

Tabla 2. Análisis de varianza para las variables fisicoquímicas y microbiológicas comparadas con un valor $P < 0.05$.

Table 2. Analysis of variance for physicochemical and microbiological variables compared at a P -value < 0.05 .

Factor	Variable FisQuím.	Valor P	Variable FisQuím.	Valor P	Variable Microbiol.	
					Valor P	Valor P
Ordeño	Grasa	0.0327*	Ác. grasos libres	0.416 ^{ns}	Levaduras	0.896 ^{ns}
Ordeño	Proteína	0.244 ^{ns}	Sólidos totales	0.359 ^{ns}	Células somáticas	0.303 ^{ns}
Ordeño	Lactosa	0.726 ^{ns}	Sólidos no grasos	0.031*	Bacterias mesófilas	0.0987 ^{ns}
Ordeño	Punto crioscópico	0.599 ^{ns}	Caseína	0.600 ^{ns}	Mohos	0.064 ^{ns}

Ordeño: manual/mecánico. Tratamiento: leche fría/caliente. Simbología: ns "no significativo"; * "significativo" con $\alpha=0.05$. FisQuím.= Fisicoquímica, Microbiol.= Microbiológica

UFC/mL); lo cual representa el 44.82 % de leche fría y el 85.92 % de leche caliente. Por otro lado, solo el 27.59 % de leche fría y el 2.82 % de leche caliente correspondieron a la clase uno ($\leq 1 \times 10^5$ UFC/mL). El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en el factor tratamiento (leche fría/caliente) (Tabla 2).

Ríos-Muñoz *et al.* (2019) y Hajmohammadi *et al.* (2021) reportaron que el CCS y BMA en leche cruda de vaca obtenida de la provincia de Irán y de granjas familiares de México, respectivamente; superaron los límites máximos permitidos para ingresar a un proceso de pasteurización o transformación. Por otro lado, la capacitación de los productores tiene impacto positivo en la mejora de la calidad microbiológica de la leche, tal como lo reportaron Silva-Paz (2020), quienes informaron que el 64 % de las unidades de

Tabla 3. Agrupamiento de parámetros fisicoquímicos para leche cruda de vaca en cantidad de productores.

Table 3. Grouping of physicochemical parameters for raw cow's milk by number of producers.

Parámetro	Especificación*	Resultados	
		No. de productores (%)	
		Fría	Caliente
Proteína (g/L)			
Clase A	≥31	27 (93.1)	64 (90.14)
Clase B	30 a 30.9	0 (0)	6 (8.45)
Clase C	28 a 29.9	2 (6.9)	1 (1.41)
Grasa (g/L)			
Clase A	≥32	23 (79.32)	57 (80.28)
Clase B	31-31.9	3 (10.34)	9 (12.68)
Clase C	30-30.9.	3 (10.34)	5 (7.04)
Lactosa (g/L)			
Deseable	43 a 50	28 (96.55)	68 (95.77)
No deseable	<43	1 (3.45)	3 (4.23)
Sólidos no grasos (g/L)			
Deseable	≥83	25 (86.21)	68 (88.73)
No deseable	<83	4 (13.79)	8 (11.27)

Fuente: *NMX-F-700-COFOCALEC-2012. Clase A es deseable, Clase B y C son considerados valores mínimos.

producción de leche para la elaboración de queso artesanal obtuvieron promedios deseables (50 %) y aceptables (14 %) con respecto a la NMX-F-700-COFOCALEC para mesófilos aerobios.

También en la presente investigación se evaluó el grado de cumplimiento de leche cruda sobre la presencia de OCT. Para este grupo bacteriano, la NOM-243-SSA1-2010 establece un máximo de 20 UFC/mL en leche pasteurizada, usándose como referencia muy estricta si se considera que la leche analizada aquí no ha recibido ningún tratamiento térmico. Se encontró que el 86 % de muestras de leche fría y el 80 % para leche caliente incumplen con lo estipulado en la normatividad (Figura 1). Tassew y Seifu (2011) reportaron la presencia de OCT en la etapa de producción de leche, posiblemente influenciada por la falta de higiene en los contenedores de almacenamiento y la salud de los animales en cooperativas lecheras.

Adicionalmente, la presencia de microorganismos patógenos representa un riesgo a la salud del consumidor, por lo que la normatividad mexicana a través de la NOM-243-SSA1-2010 ha establecido un límite máximo para *S. aureus* (≤10 UFC/ mL) y establece que *Salmonella* spp. esté ausente en 25 g de muestra. De nuevo es importante aclarar que son criterios para leche pasteurizada y se utilizan como referencia.

Con respecto a los recuentos de *S. aureus* en este estudio, se observaron incumplimientos en el 31 % de muestras para leche fría y 35 % para leche caliente; en lo que respecta a *Salmonella* spp. no se detectó su presencia (Figura 1). Ríos-Muñiz *et al.* (2019) analizaron un total de 96 muestras de leche cruda de tres granjas lecheras familiares de México

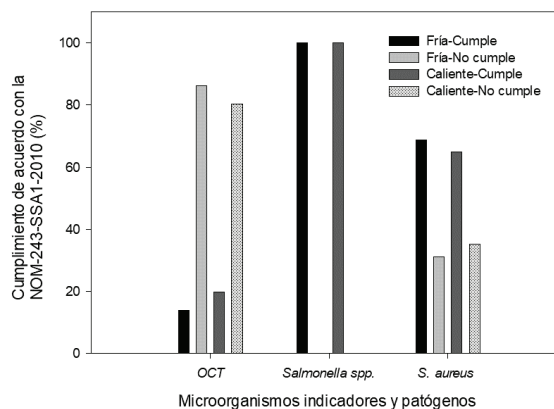


Figura 1. Cumplimiento de OCT, *Salmonella* spp. y *S. aureus* de acuerdo con los límites establecidos por la NOM-243-SSA1-2010, respecto al factor tratamiento.

Figure 1. Compliance of OCT, *Salmonella* spp. and *S. aureus* according to the NOM-243-SSA1-2010 limits, regarding the treatment factor.

durante dos años consecutivos, reportando que 83 % de las muestras fueron positivas para OCT, 54 % para OCF y 46 % para *E. coli*, no obstante; ninguna de las muestras evaluadas fue positiva para *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, o enterotoxina estafilocócica. Sin embargo, los autores aislaron e identificaron *S. aureus* en nueve muestras. Aunado a lo anterior, Lan *et al.* (2017) evaluaron 160 muestras de leche cruda, de las cuales el 52.5 % resultaron positivas para *S. aureus*, 45% a *E. coli* y 1.25 % a *Salmonella* spp. Concluyeron que la frecuencia de ordeño (2 o 3 veces al día) y la frecuencia de desinfección de la ordeñadora (1, 2 o 3 veces al día), son factores que influyen en el recuento total bacteriano y representan fuentes potenciales para la contaminación de la leche.

Es importante mencionar que no siempre se encuentra presencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en muestras de leche no pasteurizada, en este sentido se salvaguarda a los consumidores de enfermedades causadas por estos patógenos y se demuestra que la leche se encuentra libre de patógenos desde el punto de vista sanitario (Agarwal *et al.*, 2012; Vázquez-Ojeda *et al.*, 2014).

En lo que respecta a la determinación de mohos y levaduras, en la normatividad mexicana no se establecen los límites permisibles para estos microorganismos en leche. Por lo anterior, se decidió tomar como referencia los criterios de la norma NOM-243-SSA1-2010 para quesos frescos, madurados y quesos de suero (500 UFC/g); asumiendo que, si la materia prima utilizada no cumple con los límites establecidos, el producto final elaborado a partir de ella tampoco lo hará. Lo anterior repercutirá directamente en la vida de anaquel, ya que el deterioro por hongos se encuentra entre uno de los principales desafíos para la industria láctea (Awasti y Anand, 2020).

En relación con el recuento de levaduras, se obtuvieron incumplimientos de 65.52 % en leche fría y 63.38 % en leche caliente, mientras que en mohos se observaron incumplimientos del 41.38 % y 36.62 % en el mismo orden. El

deterioro por mohos en los productos lácteos es más prominente que el causado por levaduras, se han identificado 100 especies de mohos y 60 especies de levaduras que provocan deterioro en los productos lácteos, de las cuales destacan los mohos *Moniliella suaveolens*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum* y *Cladosporium cladosporioides*; en cuanto a las levaduras sobresalen *Galactomyces geotrichum*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida* spp (Garnier *et al.*, 2017). Respecto al análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas entre las variables levaduras y mohos respecto a los factores ordeño (manual/mecánico) y tratamiento (leche fría/caliente) como se puede observar en la Tabla 2.

De manera general, los resultados microbiológicos muestran un mayor porcentaje de incumplimiento en leche caliente; esto se debe a que la temperatura de conservación es un factor importante para acelerar o controlar la reproducción microbiana, según sea el caso. El incremento de microorganismos alterantes y patógenos tiene un efecto directo sobre la calidad y la vida útil del queso o derivados lácteos (Montes de Oca-Flores *et al.*, 2019), por lo que es importante cuidar que los conteos no sobrepasen los límites establecidos para cada grupo en la materia prima. Sin embargo, es importante recalcar que la normatividad mexicana no cuenta con límites máximos permisibles para los microorganismos mohos, levaduras y mesófilos aerobios para leche utilizada como materia prima y en el resto de los microorganismos indicadores y patógenos se asume que la leche es pasteurizada; por ende, al no establecer estos rangos repercute en la vida útil y de anaquel de los productos lácteos elaborados con leche cruda.

Análisis fisicoquímico

En cuanto al contenido bromatológico de la leche analizada (Tabla 3); en el caso de proteína, existe incidencia en la clase A, tanto para leche fría (93.1 %) como en caliente (90.1 %) observándose diferencias estadísticamente significativas en el factor tratamiento. Lo anterior concuerda con lo argumentado por Ajmal *et al.* (2018), en donde señala que el contenido de proteína de la leche cruda disminuye de manera significativa entre la leche que es refrigerada inmediatamente a 4 °C con respecto a la que se deja reposar a temperatura ambiente y que después de dos horas se enfría. De igual manera, en grasa la mayor ocurrencia se agrupó en la clase A, con el 79.3 % y 80.3 % para leche fría y caliente correspondientemente; por su parte el análisis estadístico mostró diferencias significativas respecto al factor tratamiento (leche fría/caliente) y el factor ordeño (manual/mecánico). Paralelamente, Guevara-Freire *et al.* (2019) menciona que las diferencias en la calidad composicional de grasa de la materia prima, pueden ser causadas principalmente por la alimentación y el hato ganadero.

Por otra parte, la mayoría de los productores cumplieron con los límites establecidos en la normatividad para lactosa (43 a 50 g/L); además, no se observaron diferencias significativas respecto a ningún factor estudiado. Contra-

riamente, si se observaron diferencias en la variable sólidos totales respecto al factor tratamiento (leche fría/caliente), en los sólidos no grasos respecto al factor ordeño (manual/mecánico) y la caseína respecto al factor tratamiento como se observa en la Tabla 2. Los resultados de la presente investigación coinciden con otros trabajos, como el realizado en tres subregiones de Colombia donde analizaron 150 muestras de leche cruda; los parámetros fisicoquímicos se encontraron con valores aceptables lo que indica excelente calidad (Romero *et al.*, 2018). En otra publicación se encontró que el contenido de grasa (33.11 g/L), lactosa (deseable) y proteína (39.89 g/L) permaneció dentro de los parámetros de la normatividad en 21 muestras de leche y queso (Montes de Oca-Flores *et al.*, 2019).

Contrariamente, autores como Gwandu *et al.* (2018), reportaron valores por debajo de lo establecido en grasa y de sólidos totales de 98 muestras de leche cruda, en la isla de Pemba, Zanzíbar, Tanzania. Los sólidos totales en la leche cruda de vaca son un indicador importante del valor nutricional, ya que determina los niveles de carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas y minerales. El cumplimiento de los parámetros fisicoquímicos es de gran importancia en la transformación de la materia prima; por ejemplo, el rendimiento del queso está directamente relacionado con el nivel de grasa y caseína; y se ha demostrado que la proteína es la que influye directamente en el rendimiento (Montes de Oca-Flores *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

En el conocimiento de este estudio se integra la determinación de la calidad de leche cruda para la elaboración de productos lácteos artesanales en Jalisco y en específico para la región alteña de Tepatlán de Morelos. En general y de acuerdo con los límites establecidos en la normatividad mexicana, la calidad microbiológica de la leche cruda para la elaboración de productos artesanales fue deficiente; mientras que, la calidad fisicoquímica fue buena. A pesar de que *Salmonella* spp. se mantuvo ausente en todas las muestras analizadas, el conteo de células somáticas, bacterias mesófilas aerobias, organismos coliformes totales, *S. aureus*, mohos y levaduras; reflejan mala calidad microbiológica de la leche que se entrega a la fábrica transformadora; siendo esto posiblemente la consecuencia de malas prácticas de higiene durante el ordeño, almacenamiento y transporte de la materia prima. Por otro lado, la calidad fisicoquímica de la leche analizada fue buena y cumple con las especificaciones establecidas en la normativa mexicana. Es imperativo que los productores de leche de donde provienen las muestras en estudio, implementen mejoras en las prácticas de ordeño adecuadas que garanticen la calidad sanitaria de la leche con la finalidad de obtener productos transformados artesanales de calidad aceptable para su comercialización. Finalmente, es imperativo señalar que, aunque los resultados fisicoquímicos son buenos, la mala calidad microbiológica afecta gravemente la vida de anaquel de la materia prima y los productos lácteos elaborados con esta leche; además, se

pueden afectar ciertos parámetros fisicoquímicos específicos como pH, acidez, proteólisis, entre otros.

REFERENCIA

- Agarwal, A., Awasthi, V., Dua, A., Ganguly, S., Garg, V. y Marwaha, S. 2012. Microbiological profile of milk: Impact of household practices. *Indian Journal of Public Health*. 56: 88-94.
- Ajmal, M., Nadeem, M., Imran, M., Abid, M., Batool, M., Khan, I.T., Gulzar, N. y Tayyab, M. 2018. Impact of immediate and delayed chilling of raw milk on chemical changes in lipid fraction of pasteurized milk. *Lipids in Health and Disease*. 17: 190-200.
- Álvarez-Fuentes, G., Herrera-Haro, J.G., Alonso-Bastida, G. y Barreras-Serrano, A. 2012. Calidad de la leche cruda en unidades de producción familiar del sur de Ciudad de México. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 44: 237-242.
- Awasti, N. y Anand, S. 2020. The role of yeast and molds in dairy industry: An update. En: *Dairy processing: advanced research to applications*. pp 243-262. Springer, Singapur.
- Brousett-Minaya, M., Torres, A., Chambi, A., Mamani, B. y Gutiérrez, H. 2015. Physicochemical, microbiological and toxicological quality of raw milk in cattle basins of the region Puno-Peru. *Scientia agropecuaria*. 6: 165-176.
- Cervantes, F., Cesín, A. y Mamani, I. 2013. La calidad estándar de la leche en el estado de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 4: 75-86.
- Chombo-Morales, M.P. y Ramírez-Cerda, E.L. 2017. Producción y manejo inocuo de leche y productos de leche en México. En: *Inocuidad y trazabilidad en los alimentos mexicanos*. Lugo-Melchor, O.Y., Alvarado-Ozuna, C., Ramírez-Cerda, E.L. y CONACYT/Ciatej (ed.), pp. 68-70. Guadalajara, México.
- Citalan, L.H., Ramos, J.A., Salinas, R., Bucio, A., Herrera, J.G. y Orantes, M.A. 2016. Análisis sensorial de leche de vacas suplementadas con un alimento fermentado a base de pollinaza. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 3: 181-191.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). CODEX Alimentarius: Leche y productos lácteos [Consultado 22 Noviembre 2021] 2011. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i2085s/i2085s.pdf>
- Fox, E.M., Jiang, Y. y Gobius, K.S. 2018. Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission. *International Dairy Journal*. 84: 28-35.
- Fuentes-Coto, G., Ruiz-Romero, R.A., Sánchez-Gómez, J.I., Ávila-Ramírez, D.N. y Escutia-Sánchez, J. 2013. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*. 10: 419-432.
- Garnier, L., Valence, F. y Mounier, J. 2017. Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*. 5: 42-65.
- Gómez, A.A. y Mejía, O.B. 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*. 2: 38-42.
- Guevara-Freire, D., Montero-Recalde, M., Valle, L. y Avilés-Esquivel, D. 2019. Calidad de leche acopiada de pequeñas ganaderías de Cotopaxi, Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 30: 247-255.
- Gwandu, S.H., Nonga, H.E., Mdegela, R.H., Katakweba, A.S., Suleiman, T.S. y Ryoba, R. 2018. Assessment of raw cow milk quality in smallholder dairy farms in Pemba Island Zanzibar, Tanzania. *Veterinary Medicine International*. 2018: 1-9.
- Hajmohammadi, M., Valizadeh, R., Ebdalabadi, M.N., Naserian, A. y Fernandes de Olivera, C.A. 2021. Seasonal variations in some quality parameters of milk produced in Khorasan Razavi Province, Iran. *Food Science and Technology*. 41: 718-722.
- Lan, X.Y., Zhao, S.G., Zheng, N., Li, S.L., Zhang, Y.D., Liu, H.M., McKillip, J. y Wang, J.Q. 2017. Short communication: Microbiological quality of raw cow milk and its association with herd management practices in Northern China. *Journal of Dairy Science*. 100: 4294-4299.
- Licitra, G., Caccamo, M. y Lortal, S. 2019. Artisanal products made with raw milk. En: *Raw Milk*. Nero L.A. y Fernandes de Carvalho A. (ed.), pp 175-121. Academic Press. Cambridge, Massachusetts, United States.
- Luigi, T., Rojas, L. y Valbuena, O. 2013. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado de Carabobo, Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud: Salus*. 17: 25-33.
- Martínez-Vasallo, A., Ribot-Enríquez, A., Villoch-Cambas, A., Montes de Oca, N., Remón-Díaz, D. y Ponce-Ceballos, P. 2017. Calidad e inocuidad de la leche cruda en las condiciones actuales de Cuba. *Revista de Salud Animal*. 39: 51-61.
- Mejía-López, A., Rodas, S. y Baño, D. 2017. La desnaturalización de las proteínas de la leche y su influencia en el rendimiento del queso fresco. *Enfoque UTE*. 8: 121-130.
- Monroy, F. 2018. En México, 40 por ciento de la leche que se consume no es pasteurizada. *Boletín UNAM-DGCS-062 Ciudad Universitaria. Dirección General de la Comunicación Social*. Ciudad de México.
- Montes de Oca-Flores, E., Espinoza-Ortega, A. y Arriaga-Jordán, C.M. 2019. Propiedades tecnológicas y fisicoquímicas de la leche y características fisicoquímicas del queso Oaxaca tradicional. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 10: 367-378.
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. [Consultado 10 Noviembre 2021] 1994. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. [Consultado 12 Noviembre 2021] 2010. Disponible en: <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>
- Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. [Consultado 15 Noviembre 2021] 2015. Disponible en: <http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/2010/210ssa12015.pdf>
- PROFECO, No todo lo que parece leche lo es. Leche, fórmulas lácteas y productos lácteos combinados. [Consultado 20 Noviembre de 2021] 2018. Disponible en: http://sil.gobernacion.gob.mx/Archivos/Documentos/2018/09/asun_3740694_20180925_1537904094.pdf
- Proyecto de norma mexicana PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012, Sistema producto leche-Alimento-

- Lácteo-Leche cruda de vaca-Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba., Organismo Nacional de Normalización del COFOCALEC. [Consultado 6 Agosto 2021] 2012. Disponible en: <https://pdfcookie.com/documents/proy-nmx-f-700-cofocalec-2012-110212-1pdf-w5lqjezn0q27>
- Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. [Consultado 26 Noviembre 2021] 1994. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1109p.pdf>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F y Cotter, P.D. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 150: 81-94.
- Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortes, J.F., López-Saucedo, C., Angeles-Morales, E., Bobadilla-Del Valle, M., Ponce-de León, A. y Estrada-García, T. 2019. Longitudinal analysis of the microbiological quality of raw cow's milk samples collected from three small family dairy farms in Mexico over a 2-year period. *Journal of Food Protection*. 82: 2194-2200.
- Rojas-Ronquillo, M.R., Cruz-Bautista, E., Daniel-Rentería, I.C. y Lammoglia-Villagómez, M.A. 2014. Determinación de la calidad microbiológica de la leche de vaca durante la temporada invernal en Tuxpan, Veracruz. *Academia Journals*. 1-5.
- Romero P, A., Calderón R, A. y Rodríguez R, V. 2018. Evaluación de la calidad de leches crudas en tres subregiones del departamento de Sucre, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*. 10: 43-50.
- Servicio de Información Agropecuaria (SIAP), Producción Ganadera: Leche. [Consultado 18 Noviembre 2021] 2021. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
- Silva-Paz, L.E. 2019. Caracterización microbiológica y fisicoquímica del queso de Ojos Negros, B. C. México con respecto a la maduración en dos periodos estacionales. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California.
- Tassew, A. y Seifu, E. 2011. Microbial quality of raw cow's milk collected from farmers and dairy cooperatives in Bahir Dar Zuria and Mecha district, Ethiopia. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 2: 29-33.
- Vázquez-Ojeda, E. Pérez-Morales, E., Hurtado-Ayala, L. y Alcántara-Jurado, L. 2014. Evaluación de la calidad microbiológica de la leche. *Iberoamericana de Ciencias*. 1: 1-9.
- Villegas de Gante, A., Santos, A. y Cervantes, F. 2016. Los quesos mexicanos tradicionales. 1ra edición. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, Estado de México.
- Villoch, A. 2010. Buenas prácticas agropecuarias para la producción de leche: sus objetivos y relación con los códigos de higiene. *Revista de Salud Animal*. 32: 137-145.

Evaluación de infiltración con equipo TDR-300 y el modelo Green y Ampt, en suelo con aditivos orgánicos en Guasave, Sinaloa, México

Infiltration evaluation with TDR-300 equipment and the model Green and Ampt, in soil with organic additive in Guasave, Sinaloa, Mexico

Lugo-Valenzuela H¹, Prado-Hernández JV¹, Vázquez-Peña MA¹, Pineda-Pineda J², Velázquez-López N¹

¹ Universidad Autónoma de Chapingo, Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5, CP 56230, Texcoco, México.

² Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico Superior de Guasave. Carretera Internacional entronque a carretera La Brecha, Ejido Burrioncito, CP 81149, Sinaloa, México.

RESUMEN

Las necesidades de agua en cultivos satisfacen en forma natural por lluvias, cuando es insuficiente, se aplica riego por gravedad, lo anterior requiere conocer comportamiento de humedad un suelo. Existen métodos para medir y estimar la humedad: el método TDR-300 calcula humedad tiempo real y el modelo de Green y Ampt que estima la lámina de riego (cm) en laboratorio. El objetivo de la investigación fue calcular y evaluar numéricamente parámetros hidrodinámicos, mezclando suelo con aditivo orgánico, utilizando equipo TDR-300, obteniendo mediciones en tiempo real, en un diseño experimental de 3 x 3, en 3 surcos de 30 m, con 6 mediciones cada 5 m, a profundidad de 30 cm a los 3 tratamientos: testigo T1 (suelo normal), T2 (Suelo + aditivo 25 g) y T3 (suelo + aditivo 50 g) aplicando riego por gravedad, y se compararon con las estimaciones obtenidas del modelo de Green y Ampt en laboratorio. Se calcularon tiempo de avance del agua, tiempo de recesión y oportunidad. A mayor contenido de aditivo orgánico, menor avance y mayor retención de agua, las estimaciones realizadas por método de Green y Ampt en laboratorio, fueron similares a los datos recolectados en campo con TDR-300.

Palabras clave: Aditivos orgánicos; infiltración; lámina de riego.

ABSTRACT

The water needs in crops are naturally satisfied by rains, when it is insufficient, gravity irrigation is applied, which requires knowing the soil's moisture behavior. There are methods to measure and estimate humidity: the TDR-300 method calculates humidity in real time and the Green and Ampt model that estimates the irrigation sheet (cm) in the laboratory. The Green and Ampt method knows the physical parameters of the 12 textural classes of soils, but does not know physical parameters by mixing soil with organic additives. In this investigation, numerical values of hydrodynamic parameters were calculated in soil mixed with organic additive, using TDR-300 equipment in three 30-m rows, with measurements every 5 m, an experimental design of 3 x 3, with T1-control treatments (soil normal), T2 (Soil + 25% additive) and T3 (soil + 50% additive), applying gravity irrigation, and compare estimates with the Green and Ampt

model. Using Green and Ampt methodology, initial and final gravimetric humidity, water advance time, recession time and opportunity were calculated. The higher the additive content, the retention increased. The estimates made by the Green and Ampt method were similar with the TDR method.

Keywords: organic additives; infiltration; irrigation sheet.

INTRODUCCIÓN

La lámina de agua requerida por los cultivos es aportada en forma natural por la lluvia, cuando esta escasea o su distribución temporal no coincide con el periodo de máxima demanda por las plantas, es necesario aportarla a través del riego (Yin y Patel, 2018). Guasave, Sinaloa, México es una región agrícola de importancia nacional, los suelos de la región son planos en su mayoría con una textura predominantemente franco arcillosa (Conagua, 2020). Como consecuencia de la extracción de agua para riego agrícola, los niveles de las aguas subterráneas han disminuido, la eficiencia del uso del agua (Habibi y Heidarpour, 2015). La gestión de los recursos hídricos es un tema importante en el campo del desarrollo sostenible, especialmente en el sector agrícola (Belaqziz *et al.*, 2013). México ocupa el sexto lugar a nivel mundial en términos de superficie con infraestructura de riego; en el Estado de Sinaloa, el distrito de riego 063 del Burrión Sinaloa (Conagua, 2020), es el principal consumidor de agua en riego por gravedad con un 90%, para siembras de maíz, frijol, sorgo, tomate, papa, chile, trigo, garbanzo y cítricos, entre otros cultivos, de alta demanda de agua (García, 2007). Existen diversos modelos para predecir la tasa de infiltración, estos se clasifican en empíricos como el propuesto por Kostiakov (1932), semi-empíricos y físicos (Muñoz-Carpena y Gowdsh, 2005). El primero no es capaz de describir a detalle el proceso de infiltración, en cambio los modelos semiempíricos y físicos basados en principios físicos describen con mayor detalle dicho proceso, entre estos se encuentra el modelo de Richard y el modelo de Green y Ampt (Ali *et al.*, 2016; Deng y Zhu, 2016). En México estos modelos no se han aplicado en suelos con altos contenidos de materia orgánica y aditivos orgánicos retenedores de humedad, no se conocen los valores numéricos de esos parámetros hidrodinámicos para el modelo de Green y Ampt para la simulación de la infiltración (Reatto *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2016) y la erosión (Mao *et al.*, 2016) bajo estas condiciones. El modelo de Green y Ampt

*Autores para correspondencia: Homero Lugo Valenzuela
 Correo electrónico: hlv_300@hotmail.com.

Recibido: 17 de diciembre 2021

Aceptado: 6 de enero 2022

se aplica en suelos uniformes, estratificados, condiciones de precipitación estable o inestables (Deng y Zhu, 2016) y para condiciones homogéneas en contenido de humedad inicial (Rao *et al.*, 2009; Haibili y Heidarpour, 2015). Este modelo asume conductividad hidráulica y contenido de agua constante en las zonas de humedecimiento y una carga constante negativa en el frente de mojado (Haibili y Heidarpour, 2015). El objetivo de esta investigación fue calcular y evaluar numéricamente la efectividad de los parámetros hidrodinámicos, mezclando suelo con aditivo orgánico, utilizando equipo TDR-300 en campo tiempo real y se compararon con las estimaciones obtenidas del modelo de Green y Ampt en laboratorio, también se midió el tiempo de avance, recesión de agua y conocer el umbral de riego en un suelo agrícola en el Burriónico, Guasave, Sinaloa, México. Así como estudiar el efecto que tienen la incorporación de aditivo orgánico como mejorador de las propiedades físicas del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el campo en un terreno ubicado en el distrito de riego número 35 "el Burrión" en Guasave, Sinaloa, México a 25° 58' latitud norte, 108° 52' longitud oeste, 220 msnm, en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Guasave, Sinaloa (ITSG). El terreno cuenta con un sistema de riego por gravedad. Antes de establecer el experimento se realizaron actividades tales como: la incorporación de los aditivos se realizó de manera manual, basándose en las curvas de retención de humedad (figura 2), homogenizando con barbecho, rastreos, nivelación, marca de los surcos, fertilizadora y una canalera agrícola. Para evaluar dos modelos, es necesario que el diseño sea exitoso y estable, depende de una serie de factores físicos, como la selección adecuada de los componentes de la misma y el método de procesamiento (Mendoza-Sánchez *et al.*, 2021). Se aplicaron los riegos, en tres surcos de cada tratamiento, con sifones de aluminio de 2.54 cm de diámetro, se instalaron las compuertas en las regaderas con un mismo tamaño con la finalidad de garantizar la misma carga y gastos ($20 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) en los sifones. Se aforaron los sifones volumétricamente empleando un recipiente de 30 L y un cronómetro. Se realizaron mediciones de los tiempos de avance del riego y de recesión a distancias de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 m de avance, se calculó el tiempo de oportunidad en cada tratamiento que se define como la diferencia entre el tiempo de recesión y el tiempo de avance, este dato es útil en la ecuación de Green y Ampt para estimar la lámina infiltrada (cm).

Medición de la lámina infiltrada

Se midieron las humedades a diferentes distancias (5, 10, 15, 20, 25 y 30 m) y para cada distancia se obtuvo el promedio de las mediciones a las profundidades de 30 cm. Se determinaron las láminas de riego para cada tratamiento. Se realizaron mediciones manuales de la humedad en el suelo con un sensor TDR (Time Domain Reflectometry) modelo TDR-300 (Spectrum Technologies Inc., Plainfield, IL). El diseño experimental fue de 3 x 3 en surcos de 30 m, se utilizaron tres

tratamientos: testigo (T1) = sin aditivo con 3 repeticiones, tratamiento 2 (T2) = suelo + 25 g aditivo orgánico por kg^{-1} de suelo con 3 repeticiones y el tratamiento 3 (T3) = suelo + 50 g aditivo orgánico por kg^{-1} de suelo con 3 repeticiones, con nueve surcos de 80 cm ancho x 30 m largo, se realizaron 6 mediciones de cada 5 m (0-5,5-10,10-15,20-25,25-30), como se muestra en la Figura 1.

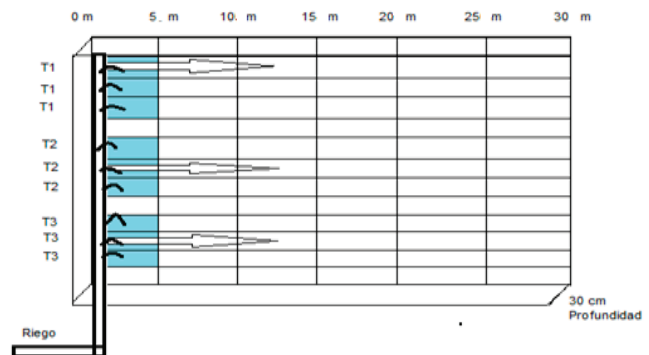


Figura 1. Esquema del experimento, con seis puntos de medición (5, 10, 15, 20, 25, 30 m) con tres tratamientos (T1 = testigo, T2 = suelo + 25 g de aditivo orgánico, T3 = 50 g aditivo orgánico) a una profundidad de 30 cm de profundidad para calcular humedad volumétrica en tiempo real con TDR-300, tiempo de avance y recesión en Burriónico, Guasave, Sinaloa, México.

Figure 1. Experiment scheme, with six measurement points (5, 10, 15, 20, 25, 30 m) with three treatments (T1 = control, T2 = soil + 25 g of organic additive, T3 = 50 g organic additive) at a depth of 30 cm to calculate humidity volumetric in real time with TDR-300, time of advance and recession in Burriónico, Guasave, Sinaloa, Mexico.

El aditivo orgánico se incorporó a una profundidad de 30 cm, con equipo de cultivo, la cantidad de aditivo incorporado en cada tratamiento equivale a 0, 2.5 y 5 t/ha, se calculó el caudal de entrada con una pendiente de 10 cm, usando sifones de 1 plg de diámetro. Una vez introducida el agua a los surcos se evaluó tiempo de avance y de recesión, cada 5 m hasta llegar a los 30 m de distancia, se realizaron 6 mediciones con equipo de TDR-300 con aguja de 30 cm profundidad. Se realizó un análisis de varianza y prueba de medias por el método de Tukey (Figura 5) a los datos estimados de la lámina de infiltración con el modelo de Green y Ampt y estimados con los datos de humedad medidos con el sensor TDR para cada uno de los tratamientos, el análisis se realizó con el programa R-Project versión 2.14.2 (2018).

Propiedades físicas de los suelos de los tratamientos

Las propiedades físicas del suelo se determinaron para los tres tratamientos, estas variables fueron: textura, densidad aparente (ρ_a), densidad real (ρ_b), materia orgánica (MO), capacidad de campo (CC), punto de marchitez permanente (PMP), conductividad hidráulica (K_s), índice de distribución de poros (λ) y humedad gravimétrica inicial (θ_i) (Ravazzani *et al.*, 2018). Una vez determinados estos parámetros físicos (Tabla 1) se calcularon las láminas infiltradas de riego (Lr) Green y Ampt (1911). La textura se realizó por el método de Boyocus dando como resultado: 26 % de arena, 39 % arcilla y 35 % de limo dando como textura franco arcilloso Green y Ampt (1911).

Estimación de lámina infiltrada

Las láminas infiltradas de riego se evaluaron con el modelo de Green y Ampt (1911), ecuación 1.

$$I = K_s t + \lambda \ln\left(1 + \frac{I}{\lambda}\right) \quad (1)$$

Dónde: **I** es la cantidad de infiltración acumulada en (cm), **t** es el tiempo de oportunidad (h), **λ** es el índice de porosidad ($\text{cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}$) y **K_s** es la conductividad hidráulica a saturación en (cm h^{-1}).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta la curva de tensión de humedad que caracterizó a cada uno de los tratamientos experimentales, en esta se aprecia la variabilidad en la capacidad de almacenamiento del agua de los tres tratamientos, siendo el testigo T1 (Suelo sin ningún mejorador) el que presentó los valores más bajos, con un contenido de humedad a capacidad de campo (θ_{CC}) de $0.41 \text{ cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}$ y un punto de marchitez permanente (θ_{PMP}) de $0.135 \text{ cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}$. Los 2 tratamientos con mayor capacidad de retención fueron: T2 (0.37 y $0.14 \text{ cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}$) y T3 (0.39 y $0.14 \text{ cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}$).

Se aprecia el incremento de humedad retenida por los tratamientos con materiales orgánicos, los cuales tienen una diferencia de hasta el $0.10 \text{ cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}$ de agua retenida, donde los mejores tratamientos (T2 y T3) fueron con aditivos orgánicos. En el tratamiento T3 se encontró el mayor almacenamiento de agua fácilmente disponible (30%) para la planta. Esto ha motivado la búsqueda de alternativas más sostenibles que permitan aumentar la retención de humedad, que satisfaga las necesidades del productor y conserven el medio ambiente, como el de la agricultura orgánica, la cual utiliza abonos orgánicos (Adame-García *et al.*, 2021).

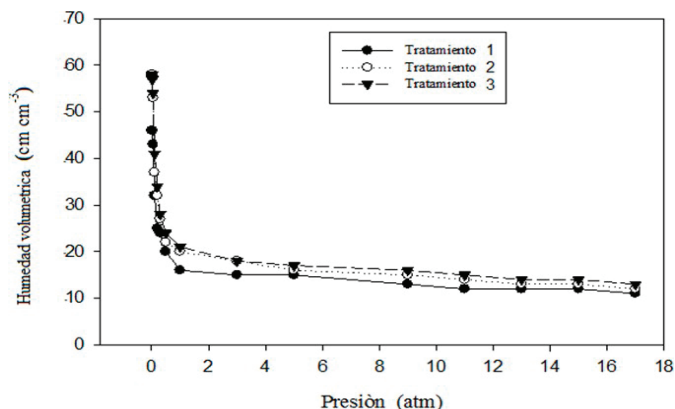


Figura 2. Curvas de retención de humedad para tres tratamientos con diferente dosis de aditivo orgánico: Testigo (T1) = suelo normal, tratamiento 2 (T2) = suelo + 25 g de aditivo orgánico y tratamiento 3 (T3) = suelo + 50 g de aditivo orgánico.

Figure 2. Curves retention the treatments for three treatments with different doses of organic additive: witness (T1) = normal soil, treatment 2 (T2) = soil + 25 g of organic additive and treatment 3 (T3) = soil + 50 g of additive.

Tabla 1. Características físicas de los suelos con diferentes dosis de aditivo orgánico en Guasave, Sinaloa, México.

Table 1. Physical characteristics of soils with different doses of organic additive in Guasave, Sinaloa, Mexico.

Parámetros	Símbolo	T1	T2	T3
Materia orgánica (%)	MO	1.1	1.2	1.3
Densidad aparente (g cm^{-3})	Pb	1.5	1.1	1.1
Densidad real (g cm^{-3})	Pa	2.6	2.6	2.6
Humedad volumétrica a saturación ($\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$)	θ_s	0.5	0.6	0.6
Porosidad total (cm)	θ	0.4	0.5	0.6
Conductividad hidráulica (cm h^{-1})	K_s	3.4	4	3.9
Capacidad de campo volumétrica (%)	CC	24	27	28
Presión capilar en el frente de humedecimiento ($\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$)	ψ_f	33	31	30

Testigo (T1) = suelo normal, tratamiento 2 (T2) = suelo+25 g aditivo orgánico y tratamiento 3 (T3) = suelo+50 g aditivo orgánico.

En la Tabla 1 se presentan los valores de los parámetros físicos evaluados en laboratorio de las unidades experimentales para cada tratamiento.

Tiempo de avance y recesión

Se observa el efecto que tienen los aditivos orgánicos incorporados en el suelo, ya que el tiempo de avance medidos a diferentes distancias, resultaron menores en los suelos con mayor contenido de aditivo correspondiente al tratamiento 3, seguido por el tratamiento 2 y finalmente los menores tiempos de avance fueron para el testigo, el efecto fue diferente en los tres tratamientos. Esto debido al cambio en las propiedades físicas del suelo que le confirió la incorporación de aditivo, especialmente en la porosidad total (θ) que a su vez mejoró la conductividad hidráulica (K_s) en los suelos, como lo indica en sus estudios del suelo y sus efectos en investigaciones relacionadas con Ndiaye *et al.* (2007). Actualmente, se tiene el desconocimiento del manejo adecuado de los sistemas de riego, por la falta de aplicación de conocimientos de investigaciones realizadas, en particular en los sistemas de riego por gravedad donde se tienen eficiencias muy bajas del orden de 30%; esto significa que existe un uso inadecuado del recurso hídrico, provocando un desperdicio importante de este recurso, aunado a esto, se tiene poca información sobre la medición del consumo neto de agua por los cultivos (Ojeda-Bustamante, 2015). Esta información resulta de gran interés para regiones que tienen a la agricultura como una actividad de gran relevancia, como es el estado de Sinaloa. La evaluación de diferentes materiales orgánicos como mejoradores de las propiedades del suelo, puede ser de vital apoyo para el manejo eficiente de los sistemas de riego por gravedad ayudando a retener más humedad y para hacer planificaciones del riego con el fin de optimizar el uso del recurso hídrico como los mencionan Rallo *et al.* (2011) y Mun *et al.* (2015).

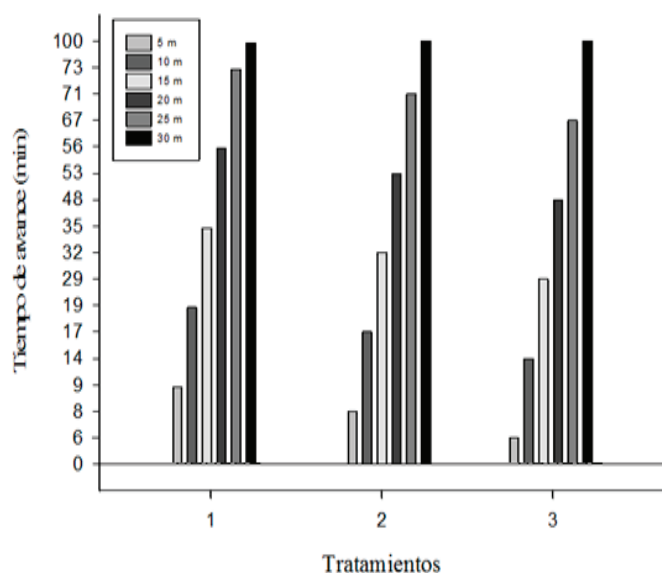


Figura 3. Avance del riego a diferente distancia para tres tratamientos con diferente dosis de aditivo orgánico: Testigo (T1) = suelo normal, tratamiento 2 (T2) = suelo + 25 g de aditivo orgánico y tratamiento 3 (T3) = suelo + 50 g de aditivo orgánico.

Figure 3. Irrigation advance at different distances for three treatments with different doses of organic additive: witness (T1) = normal soil, treatment 2 (T2) = soil + 25 g of organic additive and treatment 3 (T3) = soil + 50 g of additive.

Tiempos de oportunidad

Con la información recabada en campo de los tiempos de avance y tiempos de recesión en cada tramo de surco evaluado, se calcularon los tiempos de oportunidad, los cuales se presentan en la Figura 2, donde se observa que los valores de los tiempos de avance resultaron diferentes entre sí; esto significa desde el punto de vista práctico, que la incorporación de aditivo orgánico promueve de manera significativa la adsorción y retención de la humedad en el suelo, lo que ayuda a tener una mayor uniformidad de las láminas. En los últimos años, el aumento de la población así como la actividad antropogénica ligada a la industrialización y urbanización, han generado gran cantidad de productos de desecho biomasa, los cuales han sido incorporados al agua y suelo, ocasionando modificaciones en los servicios ecosistémicos que este último provee la agricultura (López-Pacheco *et al.*, 2020).

En esta investigación se obtuvieron menores tiempos de oportunidad en la aplicación de riego con la aplicación de mejoradores orgánicos, por consiguiente, se puede decir que para un sistema de riego por gravedad se espera tener mayor uniformidad en las láminas infiltradas y por lo tanto, mayores eficiencias. A través del tiempo se han propuesto distintos métodos para estimar las láminas de infiltración en el suelo, desde modelos empíricos como el de Kostiaov (1932), que son aplicados para ciertas condiciones específicas, hasta modelos más mecanicistas basados en principios físicos como el modelo de Richard, aunque su aplicación es limitada por el número de parámetros y variables de estado a determinar (Ali, 2016). Como alternativa, en esta investigación se evaluó

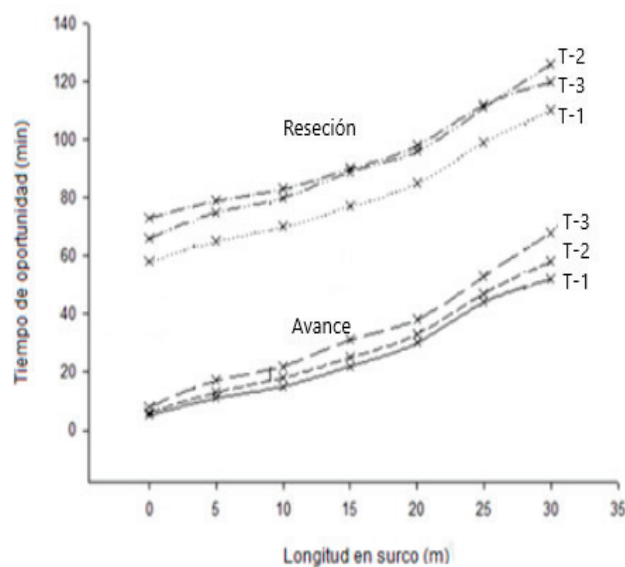


Figura 4. Curvas de tiempo de avance y recesión en suelos con diferente dosis de aditivo orgánico: Testigo (T1) = suelo normal, tratamiento 2 (T2) = suelo + 25 g de aditivo orgánico y tratamiento 3 (T3) = suelo + 50 g de aditivo orgánico, T1, T2 y T3 es el avance y R1, R2 y R3 es la recesión a diferentes tiempos.

Figure 4. Advance and recession time curves in soils with different doses of organic additive: witness (T1) = normal soil, treatment 2 (T2) = soil + 25 g of organic additive and treatment 3 (T3) = soil + 50 g of organic additive. T1, T2 and T3 is the advance and R1, R2 and R3 is the recession at different times.

el modelo de Green y Ampt (Prado-Hernández, 2017) un modelo más simple, semi-empírico, con pocos parámetros y fácil de implementar para diferentes tipos de suelos.

Estimación de láminas infiltradas con el modelo Green y Ampt

Con las determinaciones de las propiedades físicas y los tiempos de recesión calculados, se evaluó el modelo de Green y Ampt (Ecuación 1) como lo indican Prado-Hernández (2017); los valores estimados de las láminas infiltradas se muestran en la Tabla 2, en donde se observa que los valores promedio son ligeramente diferentes para los tres tratamientos hasta los 20 m de longitud del surco, después, las diferencias entre los tratamientos tienden a ser en un 10% diferentes, existiendo una mayor retención en el tratamiento 3. La adición del aditivo orgánico provocó modificaciones en los valores de densidad aparente, en la conductividad hidráulica y en la porosidad, trayendo consigo una diferencia homogénea de las propiedades hidrodinámicas en los tratamientos evaluados, ya que estas propiedades están muy correlacionadas entre sí, como lo menciona Moret y Arrué (2007).

Laminas infiltradas estimadas de las mediciones del sensor TDR-300

En la Tabla 3 se muestran los valores de infiltración calculados considerando la humedad inicial y las humedades finales medidas con el sensor TDR-300, donde las láminas

Tabla 2. Láminas de infiltración (cm) estimadas con el modelo de Green y Ampt.
Table 2. Infiltration sheets (cm) estimated with the Green and Ampt model.

Distancia (m)	Testigo 1				Tratamiento 2				Tratamiento 3			
	R1	R2	R3	Media	R1	R2	R3	Media	R1	R2	R3	Media
0	14	8.9	8.9	13	16	16	16	16	16	16	16	16
5	14	14	13	13	14	14	14	14	16	16	16	16
10	12	12	12	12	14	14	14	13	15	15	15	15
15	12	13	12	12	14	14	14	13	15	14	14	14
20	11	12	12	11	13	14	14	13	14	14	14	14
25	11	11	11	10	14	14	14	13	14	14	14	14
30	9	9.4	9.2	9	11	11	11	11	12	12	12	12

Testigo (T1) = suelo normal, tratamiento 2 (T2) = suelo+20 g aditivo orgánico y tratamiento 3 (T3) = suelo+40 g aditivo orgánico.

de los tratamientos 2 y 3 son ligeramente mayores a las láminas infiltradas en relación al testigo (T1) a lo largo de los surcos. Esto refuerza los resultados encontrados aplicando el modelo de Green y Ampt, demostrándose que la adición de materiales orgánicos como mejoradores de suelo sería una práctica ampliamente recomendable para mejorar el manejo del recurso hídrico en sistemas de riego por gravedad, a lo largo del territorio mexicano (García, 2007). Sin embargo, en el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre las láminas infiltradas estimadas con el modelo de Green y Ampt y las láminas que se estimaron con las humedades medidas con el sensor TDR para cada tratamiento ($F < 2.34$). Con los resultados obtenidos de este experimento se puede decir que el uso de sensores TDRs, son una herramienta importante y útil en el monitoreo del régimen de humedad en los suelos (Schindler *et al.*, 2010) y la estimación de la lámina infiltrada para el manejo de los sistemas de riegos por gravedad (compuestas, sifones o por melgas).

Esto indica que el modelo de Green y Ampt es bastante robusto para caracterizar el movimiento hidrodinámico del agua en los suelos. Sin embargo, entre todos los tratamientos sí se hallaron diferencias significativas (Figura 3), lo que quiere decir que, al adicionarle materiales orgánicos a un suelo,

se mejoran las propiedades físicas de este, permitiendo así, un ahorro considerable de agua en el manejo de los sistemas de riego por gravedad, mejorando la productividad de los sistemas agrícolas (Ojeda-Bustamante, 2015).

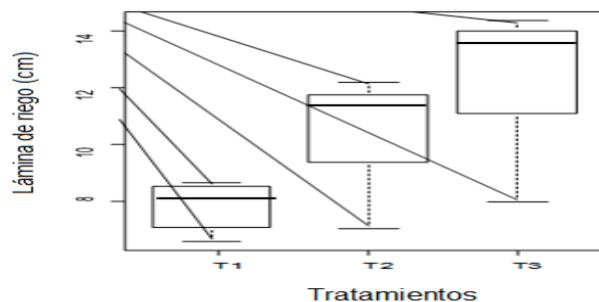


Figura 5. Comparación de medias de los tres tratamientos, con diferente dosis de aditivo orgánico en un suelo de Guasave, Sinaloa. Testigo (T1) = suelo normal, tratamiento 2 (T2) = suelo + 25 g de aditivo orgánico y tratamiento 3 (T3) = suelo + 50 g de aditivo orgánico.
Figure 5. Means comparison of the three treatments, with different doses of organic additive in a soil from Guasave, Sinaloa. Witness (T1) = normal soil, treatment 2 (T2) = soil + 25 g of organic additive and treatment 3 (T3) = soil + 50 g of organic additive.

Tabla 3. Láminas de infiltración estimadas (cm) de las mediciones del sensor TDR-300.
Table 3. Estimated infiltration sheets (cm) from TDR-300 sensor measurements.

Distancia (m)	Testigo 1				Tratamiento 2				Tratamiento 3			
	R1	R2	R3	Media	R1	R2	R3	Media	R1	R2	R3	Media
0	8.6	8.5	8.6	8.5	11	10	10	10	12	12	12.3	12
5	8.2	8.9	8.7	8.6	9.8	9.5	9.5	9.5	12	11	11	12
10	8.1	8.7	8.4	8.4	9.3	9.1	8.7	9	11	11	11	11
15	7.2	7.3	7.4	7.3	8	8.3	8.3	8.2	10	11	11	11
20	7.3	7.1	7.4	7.2	8.2	7.9	8	8	11	11	11	11
25	5.8	6.7	5.9	6.1	8.3	7.7	7.8	7.9	10	10	10	10
30	5.6	6.4	6.4	5.9	6.8	6.9	6.7	6.7	8.9	8.9	8.9	8.3

Testigo (T1) = suelo normal, tratamiento 2 (T2) = suelo + 20 g de aditivo orgánico y tratamiento 3 (T3) = suelo + 40 g de aditivo orgánico, con tres repeticiones (R1, R2 y R3).

La Figura 4 presenta las curvas de humedad a través del tiempo, siendo el tratamiento 3 el que mejor características tiene, superando al testigo y 2. El umbral de riego muestra de 10 cm de profundidad, donde el tratamiento 3 tiene demasiada humedad retenida en 16 cm y va disminuyendo de manera gradual, de acuerdo al tiempo de riego, donde los tres tratamientos tienen el mismo tiempo de riego de 1 h, el testigo de acuerdo al riego de presiembrado necesita más tiempo de riego para cumplir las necesidades requeridas y siendo mejor el tratamiento 3.

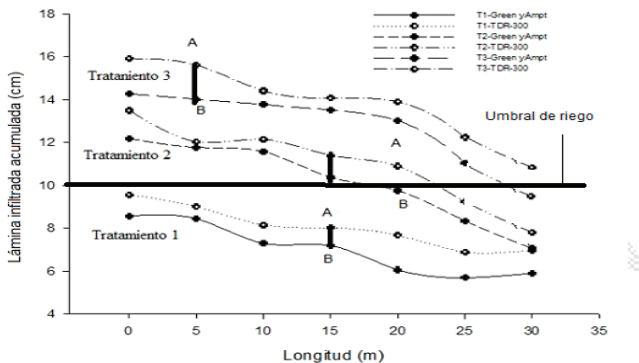


Figura 6. Comportamientos de las láminas infiltradas estimadas con el modelo de Green y Ampt y el sensor TDR-300, en un suelo de Guasave, Sinaloa.
Figure 6. Behavior of the infiltrated sheets estimated with the Green and Ampt model and the TDR-300 sensor, in a soil from Guasave, Sinaloa.

CONCLUSIONES

En la evaluación que se presenta en esta investigación el modelo de Green y Ampt puede ser utilizado para determinar las láminas infiltradas acumuladas aplicando, ya que los datos derivados de las estimaciones con el modelo fueron muy similares a los estimados de las mediciones de humedad aplicando riego por gravedad con el sensor TDR-300. La incorporación de aditivos orgánicos mejoró las propiedades físicas densidad aparente en 5%, porosidad total en 7% y la conductividad hidráulica en 6%, las cuales evaluaron la capacidad de retención de humedad de los suelos y mayor uniformidad en la aplicación del agua. Los materiales orgánicos, mejoran la retención de humedad aplicando cantidades homogéneas, de acuerdo a la evaluación el error entre los tratamientos que muestran los datos de lámina infiltrada con TDR-300 y el coeficiente de uniformidad de Chisteasen queda demostrado, que son una alternativa viable y pueden ser aplicados de acuerdo al tipo de cultivo.

REFERENCIAS

- Ali, S., Islam, A., Mishra, P. K. y Sitka, A. K. 2016. Green and Ampt approximations: a comprehensive analysis. *Journal of Hydrology*. 535: 340-355.
- Adame-García, J., Murillo-Cuevas, F. D., Flores-de la Rosa, F. R., Velázquez-Mendoza, V., López-Vázquez, M., Cabrera-Mireles, H. y Antonio-Vázquez, E. 2021. Molecular identification and evaluation of bacteria in the vegetative development and production of habanero. *Biotecnia*. 23(3): 151-157.

- Belaqziz, S., Fazziki, A. E., Mangiarotti, S., Le Page, M., Khabba, S., Raki, S. E. y Jarlan, L. 2013. An agent based modeling for the gravity irrigation management. *Journal of Procedia Agriculture the Environmental Sciences*. 19: 804-813.
- Ojeda-Bustamante, W., Sifuentes-Ibarra E. y Unland-Weiss, H. 2006. Programación integral del riego en maíz en el norte de Sinaloa, México. *Agrociencia*. 40(1): 13-25.
- Comisión Nacional del Agua - Conagua, 2020. Estadísticas agrícolas de hidrométrica y producción granos maíz, sorgo, frijol y garbanzo de la República Mexicana. [Consultado el 31 de Diciembre 2021] 2020. /http://www.edistritos.com/DR/estadisticaAgricola/cultivo.php.
- Deng, P. y Zhu, J. 2016. Analysis of effective Green and Ampt hydraulic parameters for vertically layered soils. *Journal of Hydrology*. 538: 705-712.
- García, V. 2007. Water infiltration and flow measuring of streams in la sierra de Quila. *Agrociencias*. 2: 1125-1132.
- Green, W.H. y Ampt, G. 1911. Study in soil physics. I. The flow of air and water through soils. *The Journal of Agriculture Science*. 4: 1-24.
- Mendoza-Sánchez, L. G., Rodríguez-España, M., Martínez-Rodríguez, J., García-Galindo, H. S., De la Cruz-Medina, J., Cano-Sarmiento, C. y Monroy-Rivera J. A. 2021. Evaluation of the development and stability of a vanilla (*Vanilla planifolia*) emulsion from a non-alcoholic extract. *Biotecnia*. 23: 1-26.
- Habili, M. J., y Heidarpour, M. 2015. Application of the Green and Ampt model for infiltration into layered soils. *Journal of Hydrology*. 527: 824-832.
- Kostiakov, A. 1932. On the dynamics of the coefficient of water percolation in soils and on the necessity for studying it from a dynamic point of view for purposes of amelioration. *International Society of Soil Science*. 6: 17-21.
- Mao, L., Li Y., Hao, W., Zhou, X. y Xu, C. L. T. 2016. A new method to estimate soil water infiltration based on a modified Green and Ampt model. *Soil and Tillage Research*. 161: 31-37.
- Moret, F. y Latorre. 2016. Estimate of the soil water retention curve from the sorptivity and parameter calculated from an upward infiltration experiment. *Journal of Hydrology*. 22: 95-98.
- Mun, S., Sassenrath, G.F., Schmidt, A., Lee, N., Wadsworth, M.C., Rice, B., Corbitt, Jason Q., Schneider, J.M., Tagert, M.L., Pote, J. y Prabhu, R. 2015. Uncertainty analysis of an irrigation scheduling model for water management in crop production. *Agriculture Water Management*. 155: 100-112.
- Muñoz-Carpena, R. y Gowdisha, L. 2005. Aplicación del método de infiltración de Green and Ampt con redistribución de humedad del suelo entre encharcamientos. VII Jornada de investigación en zonas no saturada del suelo. 205-213.
- Ndiaye, B., Molénat, J., Hallaire, V., Gascuel, C. y Hamon, Y. 2007. Effects of agricultural practices on hydraulic properties and water movement in soils in Brittany (France). *Soil and Tillage Research*. 93: 251-263.
- Prado-Hernández, J. V., Pascual-Ramírez, F., Cristóbal-Acevedo, D., Carrillo-García, M., Hernández-Saucedo, F. R. y Martínez-Ruiz, A. 2017. Evaluation of Green and Ampt infiltration equation in some agricultural soils in México, using USDA information and a modified method from Brooks and Corey. *Interciencia*. 42(9): 563-569.
- López-Pacheco, A. A., Escárcega-Bobadilla, M. V., Mondragón-Camarillo, L., Hayano-Kanashiro, C., Varela-Romero, A., Vilchez-Vargas, R. y Calderón, K. 2020. Evaluation of the

- nitrogen cycle in an agricultural soil disturbed with nickel-salphen and zinc-salphen compounds. *Biotecnia*. 23: 12-23.
- Rallo, G., Agnese, C., Minacapilli, M. y Provenzano, G. 2011. Comparison of SWAP and FAO agro-hydrological models to schedule irrigation of wine grape. *Journal Irrigation and Drainage*. 12: 581-591.
- Rao, M.D., Raghuwanshi, N.S. y Singh, R. 2009. Development of a physically based 1D- infiltration model for seal formed irrigated soils. *Agricultural Water Mananagent*. 85: 165-174.
- Ravazzani, D., Ricart, S., de Cartagena, F.R., Monserrat, J., de Lima, I. y Gandolfi, C. 2018. Prospects for improving gravity-fed surface irrigation systems in mediterranean European contexts. *Water* 9. 1: 20-27.
- Reatto, A., da Silva, E. M., Bruand, A., Martins, E. S. y Lima, J. E. F. W. 2008. Validity of the centrifuge method for determining the water retention properties of tropical soils. *Soil Science Society of America Journal*. 72: 1340-1547.
- Schindler, U., Durner, W., von Unold, G. y Müller, L. 2010. Evaporation method for measuring unsaturated hydraulic properties of soils. *Science Society of America Journal*. 74: 1071-1083.
- Yin, H. B. y Patel, J. 2018. Comparison of methods to determine the microbial quality of alternative irrigation waters. *Agricultural Water Management*. 201: 38-45.

Evaluación agronómica de germoplasma promisorio de batata (*Ipomoea batatas*) en el departamento del Valle del Cauca, Colombia

Agronomic evaluation of promising sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm in the department of Valle del Cauca, Colombia

Rodríguez-Henao E¹, Aguilera-Arango GA¹, Rosero A^{2*}

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Centro de Investigación Palmira. Diagonal a la intersección de la Carrera 36A con Calle 23, Palmira, Valle, Colombia.

² Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Centro de Investigación Turipaná. km. 13, vía Montería - Cereté, Córdoba, Colombia.

RESUMEN

La batata (*Ipomoea batatas* L.) es una especie de importancia económica, ya que contribuye a la seguridad alimentaria de millones de personas. Sin embargo, en Colombia esta especie es subutilizada, cultivándose de forma artesanal en la región Caribe. El objetivo de este estudio fue evaluar las características agronómicas de germoplasma de batata, bajo las condiciones agroambientales del departamento del Valle del Cauca, Colombia. Se sembraron 29 genotipos usando un diseño de bloques completos al azar y 27 genotipos, para su uso como parentales en una parcela única y evaluar la producción de semilla sexual para procesos de recombinación genética. Se encontró una respuesta diferencial entre los genotipos evaluados, sobresaliendo el genotipo 1115-200_BOL con un rendimiento de raíces tuberosas totales y de primera categoría de 64.9 t ha⁻¹ y 52.7 t ha⁻¹ respectivamente, y un porcentaje de raíces tuberosas de primera categoría del 81 %. En la producción de estructuras reproductivas, los genotipos que se destacaron fueron 0615-070_COR, 1215-227_BOL y la variedad Agrosavia Aurora. Todas estas características indicaron que es posible establecer procesos de mejoramiento y la inserción de la batata como cultivo, bajo las condiciones agroambientales del Valle del Cauca. Además, se identificaron como posibles cultivares comerciales los genotipos 1115-200_BOL y 1215-232_SUC para esta región de Colombia.

Palabras clave: Batata; genotipos; raíces tuberosas; rendimiento; variabilidad.

ABSTRACT

The sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) is a species of economic importance, because it contributes to the food security of millions of people. However, in Colombia, this specie is underutilized, being cultivated in an artisanal way in the Caribbean region. The objective of this study was to evaluate the agronomic characteristics of sweet potato germplasm, under the agro-environmental conditions of the department of Valle del Cauca, Colombia. Twentynine genotypes were sown using a randomized complete block design and 27 genotypes, for use as parents in a single plot and evaluate the production of sexual seed for genetic recombination proces-

ses. A differential response was found between the evaluated genotypes, the genotype 1115-200_BOL exhibited the highest total and first category tuberous roots yield, 64.9 t ha⁻¹ and 52.7 t ha⁻¹, respectively; showing high percentage of first category tuberous roots (81 %). Genotypes 0615-070_COR, 1215-227_BOL and the Agrosavia Aurora variety showed abundant production of reproductive structures. In general, all these traits suggested that it is possible to establish sweet potato breeding processes as well as its insertion as alternative crop, under the agro-environmental conditions of the Valle del Cauca. In addition, the 1115-200_BOL and 1215-232_SUC genotypes were identified as possible commercial cultivars for this region of Colombia.

Key words: Sweet potato; genotypes; tuberous roots; yield; variability.

INTRODUCCIÓN

La especie *Ipomoea batatas* (L.), cuyo centro de origen es América tropical, es una planta perteneciente a la familia Convolvulaceae. En Colombia es comúnmente conocida como papa dulce o batata, en Cuba se conoce como boniato y en Ecuador, México y Perú como camote (García-Méndez *et al.*, 2016). Como alimento, la batata hace parte del grupo de raíces y tubérculos, reconocidos principalmente por ser fuente de carbohidratos, como el almidón que brinda gran aporte calórico y energía, además de otros componentes como el betacaroteno presente en variedades de pulpa naranja o antocianinas en las variedades de pulpa morada, compuestos que aportan diferentes beneficios a la salud humana, lo que hace de este cultivo un sistema productivo clave para la seguridad alimentaria (Murillo-Martínez *et al.*, 2021).

En el mundo, se cultivan nueve millones de hectáreas (ha) de batata, con una producción anual estimada en 126 millones de toneladas (t), siendo China el principal productor con cerca de 54 millones de t, lo que representa el 43 % de la producción total (Faostat, 2020). En Colombia este cultivo se produce en pequeñas explotaciones agrícolas, especialmente en la zona Caribe, donde predomina el bajo uso de tecnologías, presentándose rendimientos de tan solo 6.3 t ha⁻¹; sin embargo, el potencial del cultivo debido a las

condiciones climáticas ha permitido el desarrollo de nuevas variedades que han exhibido un rendimiento alrededor de 20 t ha⁻¹, evidenciando la riqueza varietal que se encuentra en Colombia, gracias a la alta diversidad genética de batata (Rosero-Alpala *et al.*, 2019). Por esta razón, es importante realizar evaluaciones de potencial agronómico como sistema productivo y de adaptación como sistema agrícola en otras regiones de Colombia que permitan fomentar el cultivo (Mercado-Villar *et al.*, 2019).

La batata es una especie que posee gran variabilidad genética, que le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Rayas-Cabrera *et al.*, 2019). Sin embargo, como sistema productivo requiere de algunas condiciones agroecológicas específicas, ya que factores ambientales como la intensidad lumínica, el fotoperiodo, el tipo de suelo, la temperatura, la humedad relativa y las altas precipitaciones pueden influir no solo en la floración natural de esta especie, sino también en la capacidad de producir semillas sexuales y en la calidad y el contenido de nutrientes de las raíces tuberosas (Cantoral-Quispe *et al.*, 2020). Como cultivo, la batata se desarrolla bien en zonas con temperatura entre 20 y 30 °C y fotoperiodo de 12 a 13 horas por día; suelos aireados, livianos y con altos contenidos de materia orgánica (Cobeña *et al.*, 2017). La floración en la batata está influenciada directamente por el fotoperiodo, prefiriendo días cortos y temperaturas altas, encontrándose que días cortos de 10 horas y temperaturas promedio de 30 °C favorecen la mayor producción de estructuras florales, frutos y semilla sexual (Chang-La-Rosa y Rodríguez-Delfín, 2002).

La alta variabilidad fenotípica de la batata se observa en su adaptación a diferentes condiciones ambientales, especialmente a diferentes altitudes, ya que puede establecerse entre los 0 y los 3000 msnm (Martínez-Moreno *et al.*, 2020). Esta adaptación a ambientes contrastantes garantiza su fomento como cultivo comercial en diferentes zonas agroecológicas con diferente calidad y cantidad de radiación, que influyen en la eficiencia fotosintética (Adebola *et al.*, 2013), y su capacidad de producir raíces tuberosas. Genotipos con alta eficiencia de cobertura del suelo a través de la producción de biomasa foliar regulan su tasa fotosintética y parámetros asociados con el uso eficiente de agua, aspectos que benefician la habilidad de formar raíces tuberosas incluso en condiciones de estrés por alta temperatura y baja disponibilidad de agua (Burbano-Erazo *et al.*, 2020; Pérez-Pazos *et al.*, 2021).

De otro lado, el valle geográfico del río Cauca es una de las zonas con mayores índices de desarrollo agrícola de Colombia, entre sus ventajas presenta suelos con buena fertilidad, tiene diferentes pisos térmicos y cuenta con distritos de riego, lo que ha favorecido el establecimiento de gran variedad de cultivos en esta zona (Aguilera-Arango y Ortiz-Cabrera, 2020). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue conocer la adaptación de genotipos de batata, en condiciones ambientales del valle geográfico del río Cauca, Colombia, además de que se tiene interés en conocer el rendimiento del cultivo y el comportamiento de los genotipos,

lo que les permitiría ser utilizados en programas de mejoramiento genético de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Los ensayos de evaluación de rendimiento y producción de semilla sexual se realizaron en instalaciones de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, en el Centro de Investigación Palmira, ubicado en el departamento del Valle del Cauca, Colombia, con coordenadas geográficas N 3°30'51.14", O 76°18'49.20" a una altura media de 1001 msnm, temperatura media anual de 23.4 °C y precipitación anual de 1050 mm. La investigación tuvo lugar entre junio de 2020 y marzo del 2021, donde se registraron de forma semanal las variables climáticas temperatura, humedad relativa y precipitación. Los valores promedio durante la duración del experimento fueron los siguientes: (I) temperatura (mínima: 19.3 °C; media: 23.7 °C y máxima: 29.7 °C), (II) humedad relativa (mínima: 58.2 %; media: 75.5 % y máxima: 93 %); y (III) la precipitación acumulada de 914.7 mm.

Material vegetal

El germoplasma evaluado procede de la colección de batata realizada y custodiada por La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) entre los años 2013 y 2016. Estos materiales fueron evaluados agronómicamente de manera preliminar en el Centro de Investigación Turipaná, ubicado en el municipio de Cereté, departamento de Córdoba, donde fueron seleccionados los genotipos con características de interés como el alto rendimiento por unidad de área de raíces tuberosas y presencia de pigmentos naturales con compuestos bioactivos (color naranja y amarillo con contenido de betacarotenos; color morado con contenido de antocianinas), para uso como parentales en procesos de recombinación genética. Para ello, fueron seleccionados 29 genotipos promisorios por variables de rendimiento (Tabla 1) y 27 genotipos de interés como parentales por su contenido de carotenos y antocianinas (Tabla 2).

Para la propagación de las plantas, se utilizó semilla vegetativa con la finalidad de garantizar la identidad genética de cada genotipo (Okon-Nsa *et al.*, 2013). Se emplearon esquejes de los segmentos apical y preapical de las guías de la planta madre, la cual contaba con tres meses de desarrollo. Cada esqueje tenía entre 20 y 30 cm de longitud y 4 a 6 yemas viables, de las que fueron enterradas dos yemas en el caballón a un ángulo de 45 grados e inmediatamente se aplicó riego por goteo para garantizar el prendimiento del esqueje (Essilfie *et al.*, 2016).

Establecimiento del ensayo

La preparación del terreno se realizó con tractor, con un pase de subsolador y dos pases de arado. Posteriormente se realizó el levantamiento de camas o caballones a 1 m entre camas y una altura aproximada de 0.5 m. La siembra se

realizó a 0.3 m entre plantas y 1 m entre surcos, usando dos surcos, cada uno con 17 plantas para un total de 34 plantas por genotipo como parcela experimental de 10 m².

Tabla 1. Genotipos de batata seleccionados para su evaluación agronómica bajo condiciones del Valle del Cauca, Colombia

Table 1. Sweet potato genotypes selected for agronomic evaluation under conditions of Valle del Cauca, Colombia

Genotipo	Procedencia			Color de pulpa
	Municipio, Departamento	Latitud	Longitud	
0515-012_GUA	San Juan del Cesar, Guajira	10°45'19.1"	73°09'9.6"	Blanca
0515-03_CES	Becerril, Cesar	9°42'52.1"	73°16'2.7"	Naranja
0615-037_MAG	Plato, Magdalena	9°47'12.12"	74°47'36.6"	Naranja
0615-042_BOL	Zambrano, Bolívar	9°46'46.5"	74°48'52.3"	Naranja
0615-044_BOL	Carmen, Bolívar	9°40'32.6"	75°06'24.6"	Amarilla
0615-046_BOL	Carmen, Bolívar	09°44'31.7"	75°07'8.6"	Naranja
0615-052_COR	Tierralta, Córdoba	08°2'46.8"	76°10'13.9"	Naranja
0615-057_COR	Tierralta, Córdoba	08°3'20.8"	76°09'49.8"	Naranja
0615-070_COR	Lorica, Córdoba	9°18'20.0"	75°55'19.9"	Blanca
0615-071_COR	San Bernardo, Córdoba	9°19'11.8"	76°3'57.2"	Blanca
0915-144_ANT	Chigorodó, Antioquia	7°34'26.8"	76°43'51.5"	Naranja
0915-177_ANT	San Juan de Urabá, Antioquia	8°42'22.8"	76°36'28.4"	Naranja
1115-187_ATL	Santa Lucía, Atlántico	10°18'50.3"	74°57'19.1"	Amarilla
1115-188_ATL	Santa Lucía, Atlántico	10°18'50.4"	74°57'19.1"	Naranja
1115-189_ATL	Santa Lucía, Atlántico	10°18'50.5"	74°57'19.2"	Naranja
1115-190_ATL	Suan, Atlántico	10°17'24.6"	74°55'37.5"	Naranja
1115-191_ATL	Suan, Atlántico	10°17'24.9"	74°55'36.7"	Naranja
1115-193_BOL	Arroyohondo, Bolívar	10°13'5.2"	75°2'15.2"	Amarilla
1115-200_BOL	Mahates, Bolívar	10°12'47.3"	75°6'29.2"	Naranja
1115-206_ATL	Santa, Atlántico	10°21'58.5"	75°1'37.9"	Naranja
1115-207_ATL	Tubará, Atlántico	10°50'50.9"	74°58'19.2"	Blanca
1215-222_BOL	Arjona, Bolívar	10°13'56.7"	75°20'27.6"	Blanca
1215-229_SUC	San Onofre, Sucre	09°41'49"	75°29'31.9"	Naranja
1215-232_SUC	San Antonio de Palmito, Sucre	9°19'47.5"	75°30'24.7"	Naranja
1215-239_CUB	Montería, Córdoba	8°45'35"	75°53'8"	Amarilla
0316-256-STR	Palmasi, Santander	6°32'21.4"	73°17'33.4"	Blanca
Criolla	Montería, Córdoba	8°45'35"	75°53'8"	Naranja

191002-55	Palmira, Valle del Cauca	3°30'7"	76°21'22"	Naranja
Agrosavia Aurora	Montería, Córdoba	8°45'35"	75°53'08"	Naranja

Tabla 2. Genotipos de batata seleccionados para su evaluación por floración bajo condiciones del Valle del Cauca, Colombia

Table 2. Sweet potato genotypes selected for evaluation by flowering under conditions of Valle del Cauca, Colombia

Genotipo	Procedencia			Color de pulpa
	Municipio, Departamento	Latitud	Longitud	
0113-624_VAL	Palmira, Valle del Cauca	3°30'7"	76°21'22"	Blanca
0615-070_COR	Lorica, Córdoba	9°18'20"	75°55'19.9"	Blanca
0715-078_CES	Valledupar, Cesar	10°41'28"	73°19'31.1"	Blanca
0715-084_CES	Valledupar, Cesar	10°42'22.9"	73°17'47.7"	Blanca
0915-220_ANT	No Registra, Antioquia	7°34'28.7"	76°43'47.1"	Blanca
1215-222_BOL	Arjona, Bolívar	10°13'56.7"	75°20'27.6"	Blanca
1215-234_SUC	San Antonio de Palmito, Sucre	9°17'27.3"	75°33'11.7"	Blanca
0113-656_COR	Montería, Córdoba	8°45'35"	75°53'8"	Morada
0416-317_TOL	Chaparral, Tolima	3°34.51'	75° 37.58'	Morada
0515-026_GUA	Dibulla, Guajira	11°12'45.4"	73°24'21.2"	Morada
0615-050_BOL	Carmen, Bolívar	09°46'14.3"	75°8'32.4"	Morada
1215-227_BOL	San Pablo, Bolívar	10°2'7.7"	75°16'32.5"	Morada
0416-334_TOL	Rioblanco, Tolima	3°18'39"	75° 48'19"	Naranja
1115-191_ATL	Suan, Atlántico	10°17'24.9"	74°55'36.7"	Naranja
120-2145	Gamarra, Cesar	8°19'43.6"	73°43'52.8"	Naranja
1215-233_SUC	San Antonio de Palmito, Sucre	9°17'55.28"	75°33'23.9"	Naranja
0113-650_VAL	Palmira, Valle del Cauca	3°30'7"	76°21'22"	Amarilla
0113-733_VAL	Palmira, Valle del Cauca	3°30'7"	76°21'22"	Amarilla
0416-300_STR	Piedecuesta, Santander	6°56'22.1"	73°1'16.4"	Amarilla
0515-031_CES	Valledupar, Cesar	10°27'53.8"	73°14'50.3"	Amarilla
1115-199_BOL	Mahates, Bolívar	10°12'47.3"	75°6'28.9"	Amarilla
1115-201_BOL	Mahates, Bolívar	10°12'46.8"	75°6'29.2"	Amarilla
1115-202_BOL	Mahates, Bolívar	10°12'46.6"	75°6'29.6"	Amarilla
1115-204_BOL	Mahates, Bolívar	10°12'47.2"	75°6'29.6"	Amarilla
1115-205_BOL	Mahates, Bolívar	10°12'47.2"	75°6'29.7"	Amarilla
1215-239_CUB	Montería, Córdoba	8°45'35"	75°53'8"	Amarilla
Agrosavia Aurora	Montería, Córdoba	8°45'35"	75°53'8"	Amarilla

Diseño experimental

Se utilizó un diseño estadístico de bloques completos al azar (BCA) con tres bloques (repeticiones), y 29 tratamientos correspondientes a los genotipos en evaluación. El modelo que se describe a continuación explica el comportamiento de cada material genético, interpretándose mediante un diseño en BCA (Martínez y Martínez, 1997).

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

μ = es la media general.

β_i = es el efecto del *i*-ésimo bloque.

t_j = es el efecto del *j*-ésimo tratamiento

e_{ij} = es el error experimental en el *i*-ésimo bloque bajo el *j*-ésimo tratamiento.

Variables de respuesta

En el ensayo de evaluación agronómica se analizaron las variables de respuesta: (I) número de raíces tuberosas de primera categoría (peso entre 80 y 1000 g, sin daños causados por plagas o enfermedades y sin deformaciones) por parcela experimental, (II) peso de raíces tuberosas de primera categoría, (III) rendimiento estimado de raíces tuberosas totales, (IV) rendimiento estimado de raíces tuberosas de primera categoría, (V) porcentaje de raíces tuberosas de primera categoría con base en el peso total de la parcela, como indicador de la calidad en raíces tuberosas producidas por cada genotipo, (VI) porcentaje de materia seca (relación de Peso en fresco/Peso seco * 100), para lo cual se pesaron 300 g de pulpa de batata picada en trozos pequeños, posteriormente secado al horno durante 48 horas a 72 °C y al final del secado se volvieron a pesar. Las raíces tuberosas que no presentaron las características de primera categoría se consideraron como descarte. El rendimiento estimado de raíces tuberosas se calculó con base en una densidad de siembra de 33 mil plantas por hectárea. En el ensayo de evaluación de producción de semilla sexual a libre polinización se evaluaron las variables: (I) número de flores producidas por cada genotipo (para lo cual se realizó un conteo del número de flores totales producidas por m²), (II) número de frutos producidos (se cosecharon y contaron las capsulas o frutos formados a partir de las flores producidas por m²), y (III) número de semillas sexuales producidas (a los frutos cosechados se les extrajeron las semillas sexuales formadas).

Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza (ANDEVA) para las variables agronómicas evaluadas en los 29 genotipos. En los casos en que se detectaron diferencias estadísticas significativas a un nivel de $\alpha=0.01$ y $\alpha=0.05$, se realizaron pruebas de comparación de medias de Tukey con un límite de confianza de 95 %. En la parcela de 27 genotipos de batata seleccionados para uso como parentales se realizó un análisis descriptivo para las variables de producción de estructuras reproductivas a libre polinización. La información recopilada fue procesada y analizada con el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.4 (SAS Institute, 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento agronómico de los genotipos de batata evaluados

En el establecimiento de las parcelas de evaluación se obtuvo un prendimiento de 100 % de los esquejes, debido posiblemente al uso de material vegetal recién cosechado y su riego después de la siembra.

Con base en la cosecha de batata, el ensayo de evaluación agronómica que se realizó cuatro meses después de la siembra, mediante el ANDEVA se pudo identificar que, para las variables de respuestas analizadas se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p<0.01$) entre los genotipos evaluados, permitiendo evidenciar así que es posible encontrar diferentes niveles de expresión para los caracteres de interés agronómicos evaluados según la escala de respuesta para cada variable (NRTPC: Número de raíces tuberosas de primera categoría, PRTPC: Peso de raíces tuberosas de primera categoría, RERTT: Rendimiento estimado de raíces tuberosas totales, RERTPC: Rendimiento estimado de raíces tuberosas de primera categoría, PRTPC: Porcentaje de raíces tuberosas de primera categoría, CMS: Contenido de materia seca).

El ANDEVA mostró que, para las características de interés evaluadas, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p<0.01$) entre los genotipos, lo cual indica que por lo menos uno de los genotipos presentó valores de respuesta estadísticamente diferentes al de los demás (Tabla 3), según se presenta en los resultados de comparación de promedios más adelante.

Tabla 3. Análisis de varianza para el ensayo de evaluación agronómica en 29 genotipos de batata

Table 3. Analysis of variance for the agronomic evaluation test in 29 sweet potato genotypes.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Cuadrados medios					
		NRTPC	PRTPC	RERTT	RERTPC	PRTPC	CMS
Bloque	2	4709.7**	1018.5**	1031.3**	978.9**	3207.9**	2.77 ns
Genotipo	28	1850.4**	219.7**	264.1**	211.2**	466.1**	25.22**
Error	56	124.2	19.3	52.7	18.5	115.9	7.8
Total corregido	86						
R ²		0.89	0.88	0.76	0.88	0.74	0.61
CV		33.2	31.3	20.1	31.3	30.1	10.14

Nivel de significancia: $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**), no significativas (ns). **NRTPC:** Número de raíces tuberosas de primera categoría, **PRTPC:** Peso de raíces tuberosas de primera categoría, **RERTT:** Rendimiento estimado de raíces tuberosas totales, **RERTPC:** Rendimiento estimado de raíces tuberosas de primera categoría, **PRTPC:** Porcentaje de raíces tuberosas de primera categoría, **CMS:** Contenido de materia seca, **R²:** Ajuste del modelo, **GL:** Grados de libertad, **CV:** Coeficiente de variación.

El número de raíces tuberosas comerciales o de primera categoría por parcela experimental, permitió identificar que el genotipo 1115-200_BOL presentó el valor promedio más alto (140), seguido de la variedad Agrosavia Aurora con 70.7 unidades, mientras que los genotipos con menor número de raíces tuberosas fueron 1115-189_ATL, 0915-144_ANT, y 0515-012_GUA con 17, 16.7 y 16, respectivamente (Figura 1).

Para la variable peso de raíces tuberosas de batata de primera categoría, se encontró que el genotipo 1115-200_BOL presentó el mayor valor promedio con 53.7 kg en promedio por parcela experimental de 34 plantas, seguido

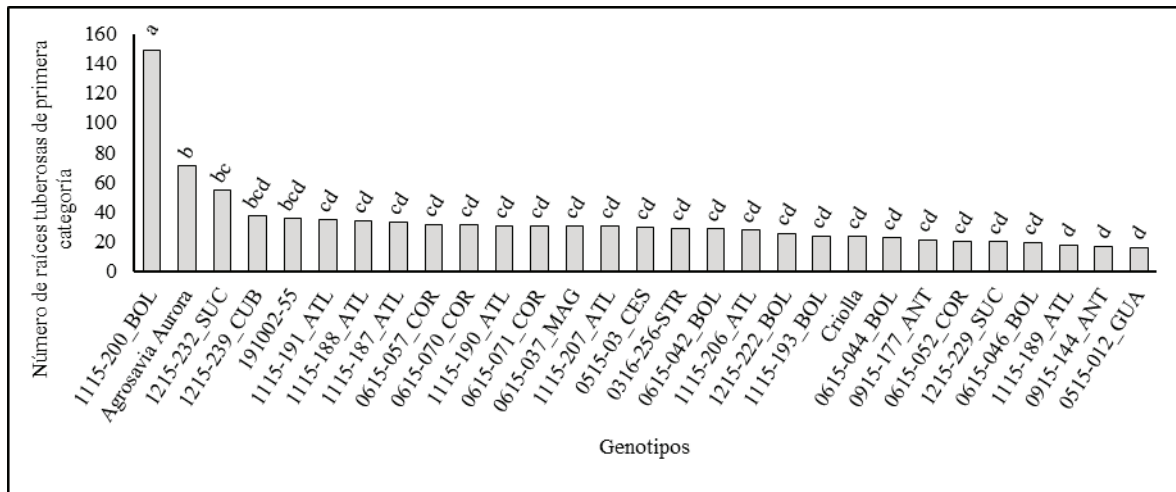


Figura 1. Comparación de medias de Tukey para la producción de raíces tuberosas de batata de primera categoría en el Valle del Cauca, Colombia. Genotipos con letra distinta difieren estadísticamente ($p \leq 0.01$).

Figure 1. Tukey comparison of means in first category sweet potato tuberos roots production in Valle del Cauca, Colombia. Genotypes with different letters differ statistically ($p \leq 0.01$).

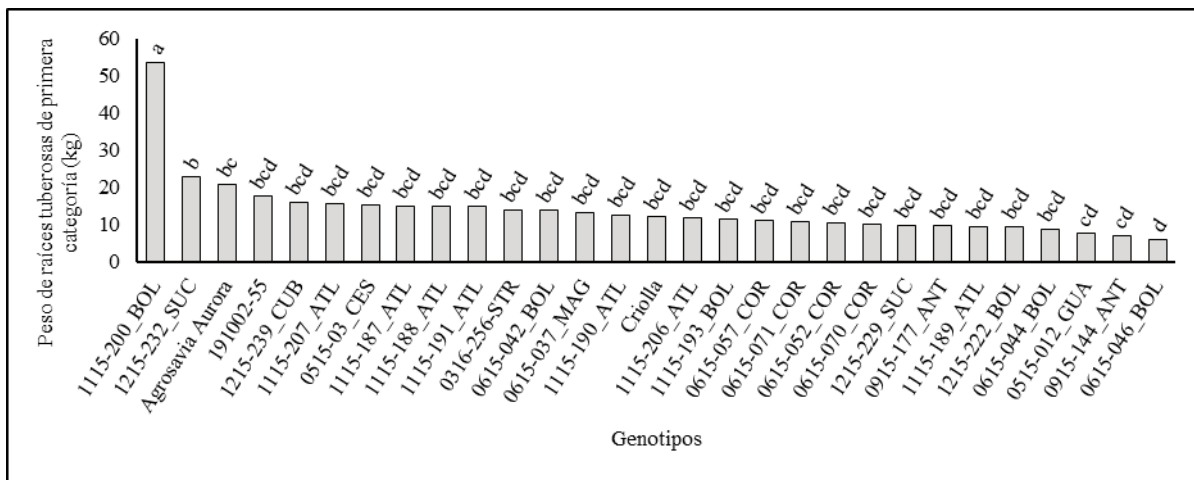


Figura 2. Comparación de promedios de Tukey para el peso de raíces tuberosas de batata de primera categoría en el Valle del Cauca, Colombia. Genotipos con letra distinta difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$).

Figure 2. Tukey comparison of means for the weight of first category sweet potato tuberos roots in Valle del Cauca, Colombia. Genotypes with different letters differ statistically ($P \leq 0.05$).

del genotipo 1215-232_SUC y la variedad Agrosavia Aurora con 22.9 y 20.9 kg respectivamente (Figura 2).

En cuanto al promedio de rendimiento estimado de raíces tuberosas totales, se encontró que el conjunto de genotipos evaluados presentó un valor promedio de 36.1 t ha⁻¹, con un mínimo de 23.2 t ha⁻¹ y un máximo de 64.9 t ha⁻¹. Los genotipos con el mayor rendimiento estimado de raíces tuberosas totales, superior a 40 t ha⁻¹ fueron: 1115-200_BOL (64.9 t ha⁻¹) seguido de la variedad Agrosavia Aurora (52.3 t ha⁻¹), 0615-052_COR (49.2 t ha⁻¹), 1115-191_ATL (49.1 t ha⁻¹), 191002-55 (45.7 t ha⁻¹), 0615-044_BOL (42 t ha⁻¹), 1115-188_ATL (41.8 t ha⁻¹) y 0515-03_CES (40.9 t ha⁻¹) (Figura 3). La reducción de raíces tuberosas comerciales se presentó principalmente por el daño causado por plagas que afectaron directamente la corteza y pulpa de la raíz tuberosa, así como también roedores que se comen la pulpa, afectando

directamente el atributo comercial, lo cual concuerda con lo reportado por Castellón y González (2020). Igualmente se presentaron malformaciones de las raíces tuberosas, como la formación de cintura, cuarteamiento y abultamientos irregulares causadas debido a factores abióticos como cambios de temperatura en el suelo, fluctuación en la humedad del suelo, deficiencias nutricionales y factores bióticos como el ataque de nematodos (Clark & Moyer, 1991), las cuales se categorizaron como no comerciales por su aspecto no uniforme (Azevedo *et al.*, 2014). Sin embargo, se encontró un rendimiento estimado de raíces tuberosas de primera categoría en un rango de rendimiento entre 5.9 y 52.7 t ha⁻¹. Los genotipos con el mayor rendimiento estimado de raíces tuberosas de primera categoría, superior a las 15 t ha⁻¹ fueron: 1115-200_BOL (52.7 t ha⁻¹), 1215-232_SUC (22.4 t ha⁻¹), la variedad Agrosavia Aurora (20.5 t ha⁻¹) y 191002-55 (17.3 t ha⁻¹) (Figura 3).

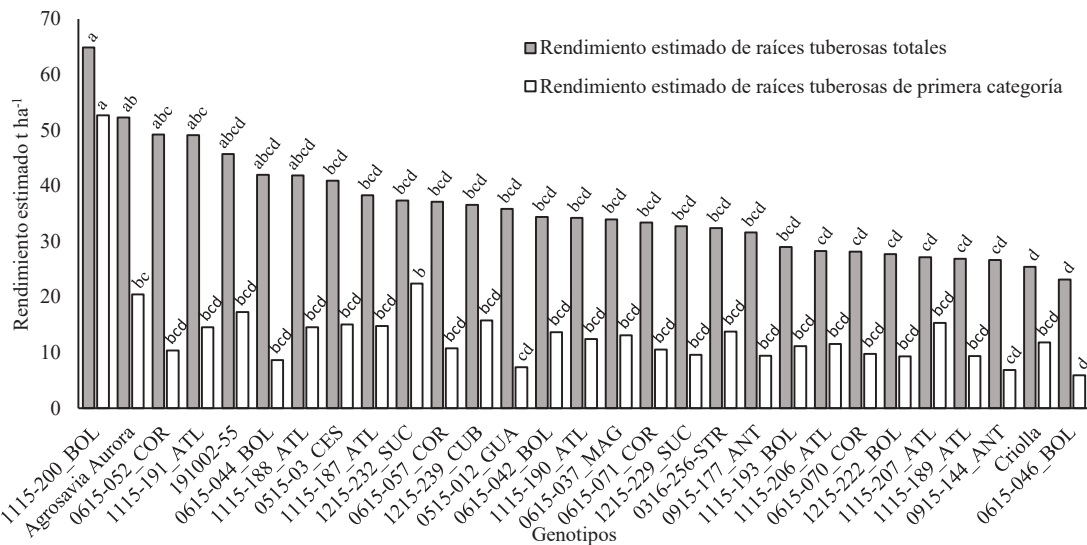


Figura 3. Comparación de promedios de Tukey para el rendimiento estimado de raíces tuberosas totales y de primera categoría de batata en el Valle del Cauca, Colombia. Genotipos con letra distinta difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$).

Figure 3. Tukey means comparison of estimated yield for total and first category tuberous roots of sweet potato in Valle del Cauca, Colombia. Genotypes with different letters differ statistically ($P \leq 0.05$).

Los resultados muestran que el mejor genotipo por rendimiento estimado de raíces tuberosas totales y de primera categoría fue el 1115-200_BOL con 64.9 y 52.7 t ha⁻¹, respectivamente. Es importante indicar que, aunque la variedad Agrosavia Aurora presentó alto valor promedio de rendimiento estimado de raíces tuberosas totales con 52.3 t ha⁻¹, esta variedad presentó alto descarte de raíces tuberosas con 60.8 %, mientras que el clon 1115-200_BOL presentó el menor valor de porcentaje de descarte entre todos los genotipos evaluados con 18.8 %.

La cuantificación de la relación entre raíces tuberosas comerciales y totales se dio mediante el cálculo del porcen-

taje de producción de raíces tuberosas de batata de primera categoría, de esta forma se encontraron valores promedios entre 81.2 y 19 %, siendo el genotipo 1115-200_BOL el de mayor producción en porcentaje de raíces tuberosas de primera categoría con 81.2 %, seguido por los genotipos 1215-232_SUC con 58 % y 1115-207_ATL con 51 %, los demás genotipos presentaron una producción de raíces tuberosas de primera categoría menor al 50 % (Figura 4).

Estos resultados fueron consistentes con estudios previos, ya que a pesar de la capacidad que tiene la batata para adaptarse a una amplia gama de condiciones de crecimiento, es sensible a la variación ambiental (Pinedo-Taco

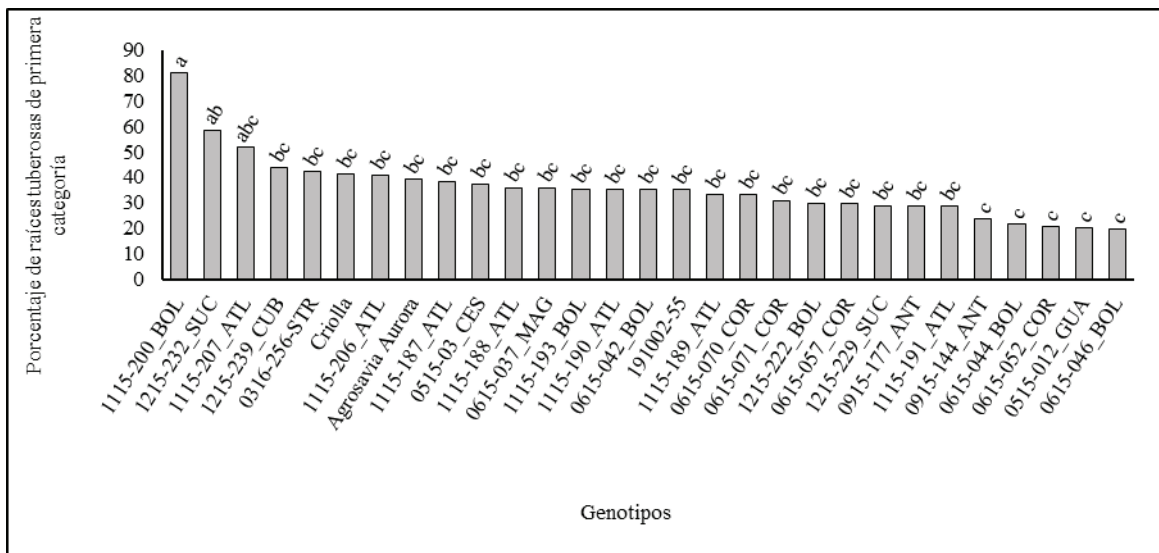


Figura 4. Comparación de promedios de Tukey para la producción de raíces tuberosas de batata de primera categoría, medida en porcentaje respecto al total de raíces tuberosas producidas en el Valle del Cauca, Colombia. Genotipos con letra distinta difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$).

Figure 4. Tukey comparison of means for first category sweet potato tuberous roots production, measured as a percentage of the total number of tuberous roots produced in Valle del Cauca, Colombia. Genotypes with different letters differ statistically ($P \leq 0.05$).

Source: Self-made.

et al., 2017), se ha reportado la influencia significativa de la interacción del genotipo ambiente en rasgos como rendimiento de raíces tuberosas totales, rendimiento de raíces tuberosas comerciales y contenido de materia seca (Adebola *et al.*, 2013). Este estudio permitió reconocer que la mejor respuesta para las variables de rendimiento de raíces tuberosas (número de raíces tuberosas de primera categoría, peso de raíces tuberosas de primera categoría, y porcentaje de raíces tuberosas de primera categoría) la presentaron los genotipos 1115-200_BOL y 1215-232_SUC, los cuales presentaron un desarrollo homogéneo de raíces tuberosas con un formato deseable para su comercialización.

Algunos genotipos presentaron un desempeño agronómico reducido por debajo de 30 t ha⁻¹ 115-193_BOL, 1115-206_ATL, 0615-070_COR, 1215-222_BOL, 1115-207_ATL, 1115-189_ATL, 0915-144_ANT, Criolla y 0615-046_BOL; y algunos incluso cuando su rendimiento total fue superior a 40 t ha⁻¹ el porcentaje de raíces tuberosas de primera categoría fue bajo, entre estos se encuentran la variedad Agrosavia Aurora con un 39.2 % de raíces tuberosas de primera categoría, 0615-052_COR (21.1 %), 1115-191_ATL (29.6 %), 191002-55 (37.8 %), 0615-044_BOL (20.6 %), 1115-188_ATL (34.8 %) y 0515-03_CES (36.8 %). Estos resultados evidencian la amplia riqueza genética en los materiales colectados y su potencial adaptación a las condiciones del Valle del Cauca; así como también las condiciones ambientales favorables como el suelo (Arenas-Julio *et al.*, 2021) para promover un buen llenado de raíces tuberosas, preservando la calidad física e impactando en el rendimiento del cultivo. En algunos casos, la contribución del ambiente a la variación en el rendimiento de la batata es mayor que la del genotipo (Adebola *et al.*, 2013). Sin embargo, la respuesta de los genotipos varía en diferentes ambientes (Grüneberg *et al.*, 2005), igualmente, el rendimiento de raíces tuberosas totales y el rendimiento de raíces tuberosas de primera categoría o comerciales

varía según el cultivar entre épocas y distancias de siembra de manera diferente (Duque *et al.*, 2022). En batata se han identificado genotipos con rendimiento estable en diferentes localidades (Abidin *et al.*, 2005), mientras que en otros casos se ha identificado adaptabilidad específica (Manrique y Hermann, 2000). Por esta razón, se deben realizar estudios de adaptación en diferentes localidades, con la finalidad de identificar variedades específicas por sitio (Jiménez-León *et al.*, 2020), lo cual corrobora los resultados obtenidos en la presente investigación, donde se confirma el potencial de algunos genotipos de batata para esta región de Colombia.

Para la variable contenido de materia seca, se encontró una variación con valores entre 30.6 y 18 % para los 29 genotipos evaluados. El genotipo con mayor contenido de materia seca fue 1115-190_ATL seguido de 0915-177_ANT y 1215-22_BOL los cuales no presentaron diferencias estadísticas para esta variable con respecto a 26 genotipos de la evaluación, presentado diferencia en el valor promedio de contenido de materia seca únicamente respecto a la variedad Agrosavia Aurora, la cual presentó el menor valor para esta variable (Figura 5).

Estos resultados fueron consistentes con previos resultados reportados por Lebot (2010) que caracterizan la batata en tres grupos de acuerdo a su color de pulpa: (i) cultivares de pulpa blanca y crema con muy alto porcentaje de materia seca ($\approx 25\text{--}35\%$); (ii) cultivares con alto contenido de materia seca ($\approx 20\text{--}30\%$), bajo contenido de azúcar y contenido medio de carotenoides, y (iii) cultivares con bajo contenido de materia seca y alto contenido de azúcar y carotenoides, particularmente de pulpa naranja profundo y de interés para exportación. Sin embargo, dentro de la diversidad evaluada se encontró algunos genotipos de pulpa anaranjada con contenidos de materia seca cercanos al 30 %, siendo estos materiales de gran interés para ser consideradas como futuras variedades en la localidad evaluada, debido a que

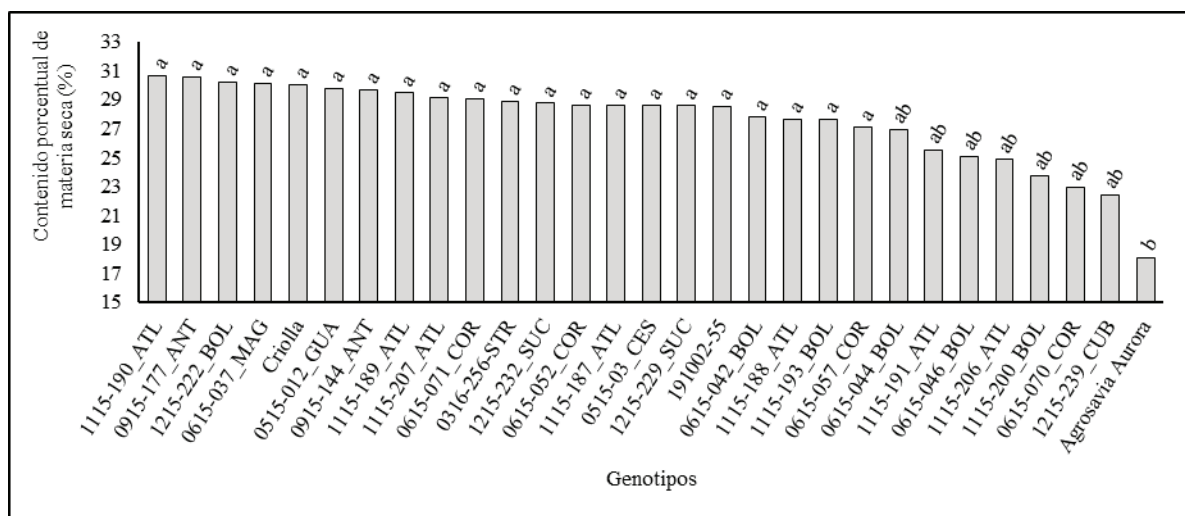


Figura 5. Comparación de promedios de Tukey para el contenido de materia seca en diferentes genotipos de batata evaluados en el Valle del Cauca, Colombia. Genotipos con letra distinta difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Figure 5. Tukey comparison of means for dry matter content in different sweet potato genotypes evaluated in Valle del Cauca, Colombia. Genotypes with different letters differ statistically ($p \leq 0.05$).

la acumulación de materia seca es un buen indicativo para cuantificar efectos ambientales dentro de un germoplasma evaluado (Monroy-Pedroza *et al.*, 2021). Existen diferentes factores que afectan el contenido de materia seca en batata como el genotipo, área geográfica, cantidad de luz, clima, prácticas culturales, tipo de suelos (Kathabwalika *et al.*, 2016), entre otras. En este caso particular, tanto el genotipo como las condiciones agroecológicas del Valle del Cauca influyeron sobre el excelente comportamiento, especialmente en los genotipos de pulpa naranja.

Producción de estructuras reproductivas

La evaluación de producción de flores, frutos y semilla sexual se realizó durante cuatro meses, después de seis meses de haberse establecido las parcelas únicas en campo. A partir de los resultados obtenidos se logró identificar que los 27 genotipos evaluados produjeron flores, frutos y semillas en diferentes proporciones, siendo diferencial entre genotipos, lo cual corresponde con lo reportado por Namoy Mwanja (2014).

Producción de flores

Bajo condiciones agroambientales del departamento del Valle del Cauca, la evaluación de la producción de flores/m² de cada genotipo permitió identificar que, a libre polinización todos los genotipos evaluados tienen la capacidad de producir floración. Por m² se encontró una producción entre 248 y 37 flores, con un promedio de 130.4 flores por genotipo. Los genotipos con mayor número de flores/m² fueron 1215-227_BOL, variedad Agrosavia Aurora, 0615-070_COR, 0515-026_GUA, y 1115-205_BOL con más de 200 flores producidas (248, 246, 227, 217 y 208 respectivamente); los genotipos con menor producción de flores fueron 0416-334_TOL y 0113-656_COR con menos de 50 flores/m² (41 y 37 respectivamente) (Figura 6). La floración de todos los genotipos evaluados favorece la recombinación genética a

partir de cruzamientos dirigidos o poli cruza para la mejora de este cultivo en la zona evaluada, ya que para producir semilla sexual la floración es un requisito (Lestari *et al.*, 2019).

Producción de frutos

La producción de cápsulas o frutos de batata presentó una variación entre 216 y 17 frutos/m², con un promedio de 73.6 frutos/m² para los genotipos evaluados. Los genotipos con mayor producción de frutos fueron 0615-070_COR y 1215-227_BOL con 216 y 212 frutos/m², y los genotipos de menor producción de frutos (menos de 25 frutos/m²) fueron 0113-656_COR, 0416-334_TOL y 0715-078_CES con 19, 18, y 17 frutos/m² (Figura 6).

Los porcentajes de producción de frutos cosechados, respecto al total de flores producidas fluctuó entre 95 y 16.5 % con un promedio de 53.1 % de producción de frutos en todo el ensayo. Los mayores porcentajes de producción de frutos los presentaron los genotipos 0615-070_COR, 1215-227_BOL y la variedad Agrosavia Aurora, con porcentajes de 95.15, 85.48 y 80.08 % respectivamente; los genotipos con menor porcentaje de producción de frutos fueron 0416-300_STR, 0515-031_CES, y 0715-078_CES con menos del 25 % de producción de frutos (24.53, 24.27 y 16.5 % respectivamente).

Estos resultados de fructificación (cuajado de frutos) son relevantes para proyectos de mejoramiento genético de esta especie, ya que en la principal zona de producción de batata en Colombia el desarrollo de estructuras reproductivas es nula en muchos genotipos, debido a la oferta agroambiental que limita la producción de flores y el cuajado de frutos (Chang-La-Rosa y Rodríguez-Delfín, 2002). Los resultados son comparables con lo reportado por Lestari *et al.* (2019) en la obtención de materiales recombinantes con diferentes genotipos de batata en Indonesia con un porcentaje de cuajado de frutos entre 35 y 87 %.

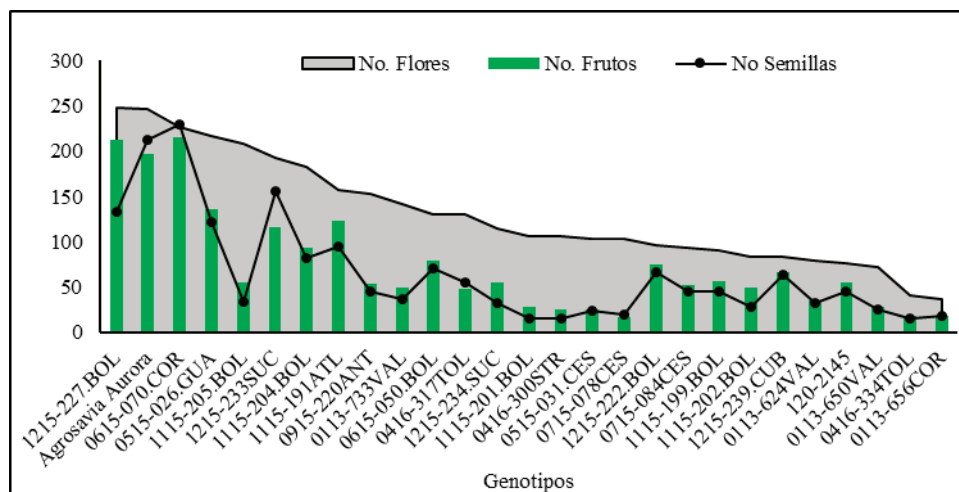


Figura 6. Producción de estructuras reproductivas en 27 genotipos de batata para uso como parentales evaluados en el Valle del Cauca, Colombia.

Figure 6. Production of reproductive structures in 27 sweet potato genotypes for use as parents evaluated in Valle del Cauca, Colombia.

Producción de semilla sexual o botánica

La producción de semilla se presentó entre 230 y 16 unidades con un promedio de 65.6 semillas. Los genotipos con producción mayor a 200 semillas fue el genotipo 0615-070_COR seguido de la variedad Agrosavia Aurora con 230 y 212 unidades respectivamente. Los genotipos con la producción más baja de semilla (inferior a 25 semillas/m²) fueron 0515-031_CES, 0715-078_CES, 0113-656_COR, 0416-334_TOL, 1115-201_BOL, y 0416-300_STR (Figura 6).

El porcentaje de cuajamiento de los frutos fluctuó entre 16.5 y 95.15 %, con un promedio general de 53.1 %, los bajos porcentajes de cuajado de frutos se debe principalmente a la incompatibilidad que presentan algunos genotipos de esta especie (Lebot, 2009). El mayor porcentaje de cuajamiento de frutos lo presentaron los genotipos 0615-070_COR con 95.15 % y 1215-227_BOL con 85.48 %; y la variedad Agrosavia Aurora con 80.01 %. Como se puede observar en la figura 6, hay producción de estructuras reproductivas en todos los genotipos. Sin embargo, la cantidad de flores, frutos y semillas es diferente para cada uno de ellos. La floración natural en batata es favorecida en ambientes con temperaturas que oscilan entre 16 y 27 °C, debido a que valores de temperatura superiores a este rango afecta la aparición de flores en esta especie (Hammett, 1985). Lo anterior posiblemente se debe a que un incremento en la temperatura aumenta la tasa de transpiración y por lo tanto la disminución en el movimiento de algunos elementos esenciales como el hierro, que es un elemento mineral importante para la floración de batata (Salisbury y Ross, 1992).

De acuerdo con los requerimientos climáticos para el desarrollo del cultivo de batata (Cobeña *et al.*, 2017) y las condiciones para su floración (Chang-La-Rosa y Rodríguez-Delfín, 2002), la zona de estudio de la presente evaluación agronómica ubicada en el departamento del Valle del Cauca, Colombia, cumple con las condiciones agroambientales para la producción del cultivo de manera comercial de acuerdo con las variables ambientales reportadas en este documento durante el desarrollo del estudio.

La respuesta de producción floral en todos los genotipos evaluados abre la posibilidad de adelantar programas de mejoramiento genético de este cultivo a través de cruza-mientos dirigidos entre genotipos seleccionados (Morales-Rodríguez *et al.*, 2017). De acuerdo con lo anterior, es oportuno aprovechar la recombinación genética en la producción de poblaciones mejoradas con características nutricionales y alto rendimiento de raíces tuberosas, aprovechando la oferta agroambiental del departamento del Valle del Cauca, con la finalidad de ampliar la base genética de la batata en Colombia.

CONCLUSIONES

Se logró establecer y evaluar germoplasma de batata bajo condiciones del valle geográfico del río Cauca, donde se observaron resultados de desempeño agronómico de esta especie que permiten argumentar su adaptación en esta región. Como posibles cultivares comerciales para esta

región del país se identificaron los genotipos 1115-200_BOL y 1215-232_SUC, debido a que presentaron una destacada producción y peso de raíces tuberosas de primera calidad con respecto a los demás genotipos evaluados. Igualmente, se encontraron resultados favorables respecto a la producción de estructuras reproductivas en los genotipos evaluados para su posterior uso como parentales, lo que evidencia que las condiciones ambientales son apropiadas para la producción de semillas sexuales, útiles para la generación de nuevas variedades en proyectos de mejoramiento genético de batata.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no declaran conflictos de interés.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (MADR) por la financiación de la presente investigación que hace parte del macroproyecto "Desarrollo de estrategias de manejo integrado del cultivo, postcosecha y aprovechamiento integral del cultivo de batata en Colombia" ejecutado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).

REFERENCIAS

- Abidin, P.F., van Eeuwijk, F., Stam, P., Struik, C., Malosetti, M., Mwanga, M., Odongo, B., Hermann M. y Carey, E. 2005. Adaptation and stability analysis of sweet potato varieties for lowinput systems in Uganda. *Plant Breeding*. 124(5): 491-497. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01149.x>
- Adebola, P.O., Shegro, A., Laurie, S.M., Zulu, L.N. y Pillay, M. 2013. Genotype x environment interaction and yield stability estimate of some sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] breeding lines in South Africa. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*. 5(9): 182-186. <https://doi.org/10.5897/JPCS2013.0387>
- Aguilera-Arango, G.A. y Ortiz-Cabrera, J.C. 2020. Distribución geográfica del caracol gigante africano en predios agrícolas del Valle del Cauca, Colombia. *Centro Agrícola*. 47(1): 5-12.
- Arenas-Julio, Y.R., Escalante-Estrada, J.A.S., Aguilar-Carpio, C., Rodríguez-Gonzalez, M.T., Sosa-Montes, E. 2021. Rentabilidad y rendimiento de girasol en función del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante. *Biotecnia*. 23(1): 45-51. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.1284>
- Azevedo, A.M., Andrade de Júnior, V.C., Viana, D.J.S., Elsayed, A.Y.A.M., Pedrosa, C.E., Neiva, I.P. y Figueiredo, J.A. 2014. Influence of harvest time and cultivation sites on the productivity and quality of sweet potato. *Horticultura Brasileira*. 32(1): 21-27. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362014000100004>
- Burbano-Erazo, E., Cordero, C., Pastrana, I., Espitia, L., Gomez, E., Morales, A., Pérez, J., López, L. y Rosero, A. 2020. Interrelation of Ecophysiological and Morpho-Agronomic Parameters in Low Altitude Evaluation of Selected Ecotypes of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.). *Horticulturae*. 6(4): 99. <https://doi.org/10.3390/horticulturae6040099>
- Cantoral-Quispe, E., Chavez-Cabrera, A. y Flores-Lázaro, A. 2020. Nueva variedad de camote (*Ipomoea batatas* L. Lam.) con mejores características agronómicas y comerciales. *Scientia Agropecuaria*. 11(1): 39-48. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.01.05>

- Castellón, M.C. y González, R.E. 2020. Primer informe de lesiones ocasionadas por *Spodoptera latifascia* (W.) (Lepidoptera: Noctuidae) en raíces tuberosas de boniato. *Agricultura Tropical*. 6(2): 59-62.
- Chang-La-Rosa, M. y Rodríguez-Delfín, A. 2002. Inducción fotoperiódica para lograr floración en cinco genotipos de camote *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Ecología Aplicada*. 1(1): 51-56. <https://doi.org/10.21704/rea.v1i1-2.229>
- Clark, C., A. Moyer, J., W. 1991. Compendio de enfermedades de la batata (Camote, boniato). The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, E.U.A. ISBN 9290601507, 9789290601500. 97 pp.
- Cobeña, G., Cañarte, E., Mendoza, A., Cárdenas, F.M y Guzmán A.M. 2017. Manual técnico del cultivo de camote. Manual N° 106. INIAP Estación Experimental Portoviejo. Manabí-Ecuador.
- Duque, L.O., Sánchez, E., Pecota, K., Yencho, C. 2022. A Win-Win Situation: Performance and Adaptability of Petite Sweetpotato Production in a Temperate Region. *Horticulturae*, 8, 172. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020172>
- Essilfie, M.E., Dapaah, H.K., Tevor, J.W. y Darkwa, K. 2016. Number of Nodes and Part of Vine Cutting Effect on the Growth and Yield of Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) in Transitional Zone of Ghana. *International Journal of Plant & Soil Science*. 9(5): 1-14. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2016/22776>
- Faostat, FAO statistical databases. [Consultado 21 Enero 2022] 2020. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
- García-Méndez, A.D., Pérez-Darniz, M.Y., García-Méndez, A.A. y Madriz-Iztúriz, P.M. 2016. Caracterización postcosecha y composición química de la batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lamb.) variedad Topera. *Agronomía Mesoamericana*. 27(2): 287-300. <https://doi.org/10.15517/AM.V27I2.21426>
- Grüneberg, W.J., Manrique, K., Zhang, D., Hermann, M. 2005. Genotype X Environment Interactions for a Diverse Set of Sweetpotato Clones Evaluated across Varying Ecogeographic Conditions in Perú. *Crop Science*. 45(6): 2160-2171. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.0533>
- Hammett, H. 1985. *Ipomoea batatas*. C.R.C. In: Handbook of Flowering Vol. III. A.H. Havely (Ed.). CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida, USA.
- Jiménez-León, J., Rascón-Chu, A., López-Elías, J., Sánchez-Villegas, A. 2020. Efecto de la variedad y fecha de siembra en el potencial productivo de remolacha azucarera. *Biotecnia*. 22(3): 5-10. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.969>
- Kathabwalika, D.M., Chilembwe, E.H.C. y Mwal, V.M. 2016. Evaluation of dry matter, starch and beta-carotene content in orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes tested in three agro-ecological zones of Malawi. *African Journal of Food Science*. 10(11): 320-326. <https://doi.org/10.5897/AJFS2016.1471>
- Lestari, S.U., Hapsari, R.I., y Basuki, N. 2019. Crossing Among Sixteen Sweet Potato Parents for Establishing Base Populations Breeding. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*. <http://doi.org/10.17503/agrivita.v41i2.1485>.
- Lebot, V. 2010. Sweet Potato. In: Handbook of plant breeding, Root and Tuber Crops. J.E. Bradshaw (Ed.), pp 97-126. Springer. United Kingdom.
- Lebot, V. 2009. Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids, CABI, Oxfordshire, UK. Pp. 91-274. DOI:10.1079/9781845934248.0000
- Manrique, K. y Hermann, M. 2000. Efecto de la interacción GxÉ sobre el rendimiento de la raíz y el contenido de betacaroteno de las variedades seleccionadas de la batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) y los clones de reproducción. Informe del programa CIP. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú.
- Martínez, R. y Martínez, N. 1997. Diseño de Experimentos - Análisis de Datos Estándar y No Estándar. Fondo Nacional Universitario. Bogotá, Colombia.
- Martínez-Moreno, D., Reyes-Matamoros, J., Andrés-Hernández, A.R. y Rivas-Arancibia, S.P. 2020. Desarrollo de variedades de camote morado bajo la óptica de plasticidad fenotípica. *RD-ICUAP*. 6(18): 17-25.
- Mercado-Villar, L.C., Barrera-Violeth, J.L. y Romero-Ferrer, J. 2019. Efecto de la densidad siembra en el crecimiento de genotipos de batata (*Ipomoea batatas* L. Lamb.). En: Sistema de siembra y uso eficiente de recursos. J.L. Hernández-Burgos y E., Cabrales-Herrera (eds.), pp 5-22. CECAR, Sincelejo, Colombia.
- Monroy-Pedroza, D., Martínez-Hernández, J.J., Gavi-Reyes, F., Torres-Aquino, M., Hernández-Ríos, I. 2021. Crecimiento, acumulación y distribución de materia seca en dos variedades de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* y *A. cruentus*) bajo fertigración. *Biotecnia*. 23(3): 14-21. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i3.1399>
- Morales-Rodríguez, A., Morales-Tejón, A.L., Rodríguez-de-Sol, D., Rodríguez-Morales, S.J. y Morales-Romero, L.M. 2017. INIVIT B-50, nuevo cultivar de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) para la agricultura cubana. *Cultivos Tropicales*. 38(2): 81-81.
- Murillo-Martínez, M., Alvis-Bermúdez, A. y Arrazola-Paternina, G. 2021. Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón obtenido de dos variedades de batata (*Ipomoea batatas*). *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 19(1): 117-127. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(19\)117-127](https://doi.org/10.18684/bsaa(19)117-127)
- Namo, O.A.T. y Mwanja, Y.P. 2014. Flowering and seed production patterns of tropical accessions of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Tropical Agriculture*. 91(1): 1-8.
- Okon-Nsa, S., Okon, D.P. y Robert, S.P. 2013. Comparative effects of chicken manure and NPK on the yield of *Ipomoea batatas*. *Journal of Agricultural and Crop Research*. 1(6): 90-93.
- Pérez-Pazos, J.V., Rosero, A., Martínez, R., Pérez, J., Morelo, J., Araujo, H. y Burbano-Erazo, E. 2021. Influence of morpho-physiological traits on root yield in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) genotypes and its adaptation in a sub-humid environment. *Scientia Horticulturae*. 275: 109703. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109703>
- Pinedo-Taco, R., Rodríguez-Soto, G., Valverde-Reyes, N. 2017. Rendimiento de 10 clones de camote (*Ipomoea batatas* L.) en Trujillo, La Molina, San Ramón y Huaral. *Aporte Santiaguino*. 10(1): 87-98. <https://doi.org/10.32911/as.2017.v10.n1.185>
- Rayas-Cabrera, A., López-Torres, J., Medero-Vega, V.R., Basail-Pérez, M., Santos-Pino, A. y Gutiérrez-Sánchez, Y. 2019. Conservación *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam por crecimiento mínimo con el uso de manitol. *Biotecnología Vegetal*. 19(1): 43-51.
- Rosero-Alpala, E.A., Pastrana-Vargas, I., García-Peña, J.A., Espitia-Montes, A.A., Sierra-Naranjo, C.M., Sierra-Monroy, J.A. y García-Herazo, J.L. 2019. Agrosavia Aurora: Variedad de batata de pulpa anaranjada para el Caribe colombiano. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Mosquera, Colombia.
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1992. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México, México.
- SAS Institute. 2018. SAS User's Guide: Statistics, version 9.4. SAS Institute. Cary, North Carolina, USA.

Elaboration of edible starch films using CaCO₃ nanoparticles and plasticizers by optimized extrusion-casting process

Elaboración de películas de almidón comestibles, a base de nanopartículas de Carbonato de Calcio y plastificantes mediante la optimización del proceso extrusión-casting

Limón-Valenzuela V¹, Aguilar-Palazuelos E^{1*}, Martínez-Bustos F², Montoya-Rodríguez A¹, Camacho-Hernández IL¹, Zazueta-Morales JJ¹, Jacobo-Valenzuela N¹, Carrillo-López A¹

¹ Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Cd. Universitaria, Av. de las Américas y Josefa Ortiz S/N, 80010 Culiacán, Sinaloa, México.

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Libramiento Norponiente, Fracc. Real de Juriquilla 76230 Querétaro, Querétaro, México.

ABSTRACT

Edible films (EF) can be produced and developed for preservation of fruits and vegetables. Starch has been considered one of the biopolymers with the greatest potential to produce edible films through different processing techniques, such as extrusion-casting. Our objective was to study the effect of calcium carbonate nanoparticles (NPsCC) and plasticizers (sorbitol- glycerol (80-20%; w/w)) produced by extrusion (EXT)-casting (CT) combination technologies, to obtain EF with improved mechanical and barrier properties. Corn starch-plasticizers were processed in a twin-screw extruder to produce modified thermoplastic starch, followed by the addition of calcium carbonate nanoparticles (CCNP) in casting to EF formation. A hybrid design (four factors; twenty-one treatments) of surface response methodology was used to optimization process. The optimal EF mechanical and barrier properties were characterized according to microstructural properties (X-ray diffraction, Scanning Electron Microscopy) to determine the damage caused in the starch during EXT and CT. In conclusion, it is possible to obtain EF with greater both Breaking Strength and Deformation, as well as, lower Water Vapor Permeability and Solubility (mechanical and barrier properties), through the use of CCNP and plasticizers, using EXT-CT combination processes.

Keywords: Starch edible films, CaCO₃ nanoparticles, extrusion, microstructural properties.

RESUMEN

Para la conservación de frutas y hortalizas, se pueden producir y desarrollar películas comestibles (PC). Para producir PC, el almidón es considerado uno de los biopolímeros con mayor potencial mediante diferentes técnicas de procesamiento como la extrusión-casting. El objetivo fue estudiar el efecto de las nanopartículas de carbonato de calcio (NPsCC) y plastificantes [sorbitol-glicerol (80-20%; p/p)] producidas mediante tecnologías combinadas de extrusión (EXT)-casting (CT) para obtener PC con propiedades mecánicas y de barrera mejoradas. La mezcla almidón de maíz-plastificantes fueron procesados en un extrusor de doble tornillo para obtener almidón termoplástico modificado seguido de la adición de NPsCC en el casting para la formación

final de la PC. Se utilizó un diseño híbrido (cuatro factores; veintiún tratamientos) de la metodología de superficie de respuesta para el proceso de optimización. Se caracterizó PC óptima acorde a propiedades mecánicas y de barrera, además, de propiedades microestructurales (difracción de rayos X, Microscopía Electrónica de Barrido) para determinar el daño causado en el almidón durante EXT y CT. En conclusión, es posible obtener PC con mayor resistencia a la rotura y deformación, así como, menor permeabilidad al vapor de agua y solubilidad, mediante el uso de NPsCC y plastificantes, utilizando la combinación EXT-CT.

Palabras clave: películas de almidón, nanopartículas de CaCO₃, extrusión, casting, propiedades microestructurales.

INTRODUCTION

Starch has been considered one of the biopolymers with the greatest potential to produce biodegradable and edible films by different processing techniques such as casting, injection or blow molding and as well as in combination with others techniques (Teixeira *et al.*, 2012, Chiumarelli y Hubinger, 2014, Li *et al.*, 2015, Calderón-Castro *et al.*, 2018). In this sense, corn starch has many advantages over other starches, and is considered the best of them due to its versatility, high availability, low cost and also, its biodegradability (Aguirre-Joya *et al.*, 2019, Galindez *et al.*, 2019, Kim *et al.*, 2019, Yildirim-Yalcin *et al.*, 2019). Although, it has acceptable physicochemical and good mechanical properties, these could be improved. Calcium carbonate nanoparticles (CCNP) are commonly used since to they add characteristics of greater elongation and resistance in the paper breakage, paint and plastics industry (Hu *et al.*, 2009, Sahebian *et al.*, 2009, Duncan, 2011, Ghadam *et al.*, 2012,), as well as, improved opacity, whiteness and brightness, and printing properties in quality paper (Buri *et al.*, 2012). Sun *et al.* (2014) used calcium carbonate nanoparticles with the purpose to improve the mechanical properties, such as flexibility and strength, of films based on corn starch and glycerol by casting. Latest, the use of nanoparticles could be considered for the production of edible starch-based films with characteristics that may improve the post-harvest preservation of fruits (Maftoonzad y Ramaswamy, 2005). Calderón-Castro *et al.* (2018) evaluated

a combined method using extrusion and casting to modify the starch macromolecular matrix (which is exposed to a variety of changes at both levels, intra and intermolecular) and for Edible Films (EF) formation. Thin layers of edible materials can be applied to the preservation, distribution and marketing of post-harvest products (McHugh, 2000, Falguera *et al.*, 2011, Fakhouri *et al.*, 2015, Buso-Ríos *et al.*, 2020). These materials act as barriers, producing modified atmospheres, reducing moisture exchange, controlling microbial growth, and carrying functional ingredients such as antioxidants and antimicrobials (Treviño-Garza *et al.*, 2015). For this reason, the aim of this work was to use calcium carbonate nanoparticles and plasticizers during extrusion (EXT)-casting (CT) combination technologies to obtain EF with improved mechanical and barrier properties.

MATERIALS AND METHODS

Film preparation

Corn starch (Ingredion, Jalisco, Mexico), sorbitol (Cedrosa, Edo. Mexico, Mexico) and glycerol (JT Baker®, Pa., U.S.A.) as well as CCNP (SkySpring Nanomaterials, Inc., TX, USA) were used for EF preparation. The corn starch composition was: 25.58 % amylose and 74.72 % amylopectin. The film preparation was carried out according to Yan *et al.* (2012) and Fitch-Vargas *et al.* (2016) with some modifications. At the first

stage, with the use of the extrusion technology, thermoplastic starch was obtained. The mixture was prepared with corn starch and plasticizers, according to the experimental design (Table 1) [sorbitol (80 %) and glycerol (20 %)]. A co-rotating twin screw extruder (Shandong Light M&E, Model LT32L, China) with a L/D of 18.5, screw compression ratio of 2:1, and a circular die with 19 mm of length, 42 mm of diameter and an output of 5 mm was used. The feed rate kept constant at 120 g/min, while moisture content ranged at different ratios according to the experimental design. Barrel temperatures in the feeding (60 °C) and transition (75 °C) zones were constant with respect to the output die temperature (E.g. ET: 90 °C); they varied according to the experimental design by 15 °C between them. The 3 heating zones were independently and electrically heated and water-cooled to maintain the temperature. The thermoplastic starch was collected in water at a 1:4 ratio and stored until use. The product obtained was named extruded formulation. In a second stage, EFs elaborated with the casting technique were obtained. First, CCNP were dissolved in 50 mL of distilled water by ultrasonic mixing (Branson Ultrasonic Cleaner, Danbury, CT, EUA). Briefly, 200 mL of extruded formulation were collected and heated for 10 minutes on a plate (Fisher Scientific, Mass., U.S.A.) at 80 °C; when the temperature reached 30 °C, calcium carbonate nanoparticles were added according to the experimental

Table 1. Experimental design of the extrusion process for four factors.

Tabla 1. Diseño experimental del proceso de extrusión para cuatro factores.

Trat*	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	CaCO ₃	ET (°C)	PC (%)	MC (%)	BS	D	WVP	WS
1	0	0	0	1.7317	1.52	90	20	25.2	13.37	11.42	1.826E-11	29.56
2	0	0	0	-0.2692	1.52	90	20	19.2	22.39	05.26	1.044E-11	25.63
3	-1	-1	-1	0.6045	0.52	80	15	21.81	18.03	07.00	1.465E-11	29.16
4	1	-1	-1	0.6045	2.52	80	15	21.81	12.28	13.40	3.092E-11	43.48
5	-1	1	-1	0.6045	0.52	100	15	21.81	25.15	06.75	1.248E-11	25.99
6	1	1	-1	0.6045	2.52	100	15	21.81	15.44	14.83	2.122E-11	36.13
7	-1	-1	1	0.6045	0.52	80	25	21.81	12.82	5.47	9.529E-12	25.49
8	1	-1	1	0.6045	2.52	80	25	21.81	26.00	4.86	8.710E-12	24.66
9	-1	1	1	0.6045	0.52	100	25	21.81	7.69	12.61	3.390E-11	41.66
10	1	1	1	0.6045	2.52	100	25	21.81	13.23	13.48	1.635E-11	31.94
11	1.5177	0	0	-1.0498	3.03	90	20	16.85	18.60	14.22	2.075E-11	32.48
12	-1.5177	0	0	-1.0498	0	90	20	16.85	24.62	11.29	1.685E-11	29.25
13	0	1.5177	0	-1.0498	1.52	105.177	20	16.85	20.32	5.66	1.238E-11	25.10
14	0	-1.5177	0	-1.0498	1.52	74.823	20	16.85	12.33	10.77	1.570E-11	28.22
15	0	0	1.5177	-1.0498	1.52	90	27.59	16.85	15.65	10.41	2.654E-11	34.85
16	0	0	-1.5177	-1.0498	1.52	90	12.41	16.85	18.08	11.00	2.725E-11	32.54
17	0	0	0	0	1.52	90	20	20	20.99	4.91	1.129E-11	23.97
18	0	0	0	0	1.52	90	20	20	17.37	9.87	1.534E-11	31.57
19	0	0	0	0	1.52	90	20	20	21.50	5.36	1.031E-11	25.26
20	0	0	0	0	1.52	90	20	20	11.13	12.66	2.572E-11	38.73
21	0	0	0	0	1.52	90	20	20	21.30	5.30	1.111E-11	25.51

*The order not corresponding to experimental run

X₁= CaCO₃= Calcium Carbonate Nanoparticles X₂= ET= Extrusion Temperature, X₃= PC= Plasticizers Content, X₄= MC= Moisture Content.

design. Subsequently, 25 mL of the gelled formulation were poured spilled out into acrylic molds, and then placed into an oven at 60 °C for 2 h ± 0.25 h. The films thickness were measured using a digital micrometer (Digital Insize, Model 3109–25A, Spain), obtaining values of 53 ± 5.22 µm. Finally, films were conditioned at 53 % of relative humidity with a saturated solution of Mg(NO₃)₂·6H₂O (JT Baker®) and they were maintained in a desiccator until analysis.

Physicochemical characterization

Mechanical properties

Breaking Strength (BS) and Deformation (D) of EF were evaluated with the use of an universal texture analyzer (INSTRON, Model 3342, Mass., U.S.A.) according the ASTM D-5748–95 (ASTM, 1995) methodology, with some modifications and recommendations made by Gontard *et al.* (1993). BS is the maximum force just before the break, and it is measured in Newtons (N), while D is the breakage distance from the contact with the sample until the break, and it is measured in millimeters (mm). Twenty EF samples from each treatment were used for measuring these mechanical properties.

Water Vapor Permeability (WVP)

The WVP of EF was determined using the gravimetric glass method according to McHugh *et al.* (1993). Films were placed with 15 g of calcium chloride on the top of glass containers (JT Baker®, Pa., U.S.A.). After that, the containers were placed into a desiccator (Dry Keeper, Sanplatec Corp., Osaka, Japan) with a saturated solution of sodium chloride to generate 75 % of RH. The weight gain of calcium chloride was registered every 12 hours for 4 days by quintuplicate; these data were used to generate a graph of weight gain versus time. WVP was determined according to the next equation:

$$WVP = \frac{Mp \times E}{A \times t \times \Delta p}$$

Where: Mp = moisture absorbed mass (g), E = film thickness (m), A = exposed film area (m²), t = time (s) and Δp = partial pressure difference through the film (Pa).

Water Solubility (WS)

The WS was determined according to the methodology reported by Gontard *et al.* (1992), as percentage of disintegrated material, as expressed in the following equation:

$$\% WS = \frac{(w_i - w_f)}{w_i} \times 100$$

Where: % WS = water solubility percent, w_i = initial weight of sample and w_f = final weight of sample.

Experimental Design

A hybrid design D416₈ of the response surface methodology (RSM) with four factors was used (Roquemore, 1976): CaCO₃ nanoparticles (CCNP: 0.00 – 3.03 %), extrusion

temperature (ET, 74.82 – 105.18 °C), plasticizers content (PC: 12.41 – 27.59 %) and moisture content (MC: 16.85 – 25.19 %). All the independent variable levels were selected according to preliminary experiments and technical limitations of the study at five levels was performed. The whole design consisted of 21 experimental points carried out in random order, which included 16 factorial and axial points, 5 center points, the center of the design was used to allow for estimation of a pure error sum of squares (Table I). A second order polynomial model was used to predict the experimental behavior:

$$y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2$$

Where: y_i = generic response; $b_{1...44}$ = regression coefficients; X_1 = CaCO₃ nanoparticles, X_2 = Extrusion Temperature and X_3 = Plasticizers Content and X_4 = Moisture Content. The numerical method was applied as optimization technique, where the main criteria for determining the optimal treatment to produce EF were better BS and D (highest values), and WVP and S (lowest values).

Microstructural characterization

To determine the damage caused in starch and plasticizers mixture with and without extrusion process and EF during casting technique, optimal treatment was characterized according to its microstructural properties (X-ray diffraction and Scanning Electron Microscopy).

X-ray diffraction

Samples of optimal treatment, at the various stages of the process were evaluated (without processing mixture -OWPM-, processing mixture -OPM- and edible film -OEF-). This samples were packed into a glass sample holder with a depth of 0.5 mm and mounted on an X-ray diffractometer (Rigaku Model Last D/Max-2100, Rigaku Denki Co. Ltd., Japan). The diffractograms were obtained as described by Gómez *et al.* (1989) with a sweep angle of Bragg of 4 – 40° over a scale of 2θ with intervals of 0.02, operating at 30 KV and 16 mA, with CuKα radiation and a wavelength λ = 1.5406 Å. Relative crystallinity was calculated using Herman's method. The percentage of relative crystallinity of the starch was measured by separating the crystalline and amorphous areas in the X-ray diffractograms using an Origin 9.0™ software. The percentage of relative crystallinity was calculated as crystalline area/total area × 100 (Aguilar-Palazuelos *et al.*, 2006).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Materials obtained were evaluated with SEM analysis, according to the Rodríguez-Castellanos *et al.* (2015) procedure. Briefly, a powder sample of both, starch and OWPM, were dispersed over the SEM plate and the films were fractured by previously cutting a film piece. Then, they were immersed in liquid nitrogen for 10 seconds, breaked and placed on the copper sample plate holder with 1.2 cm diameter car-

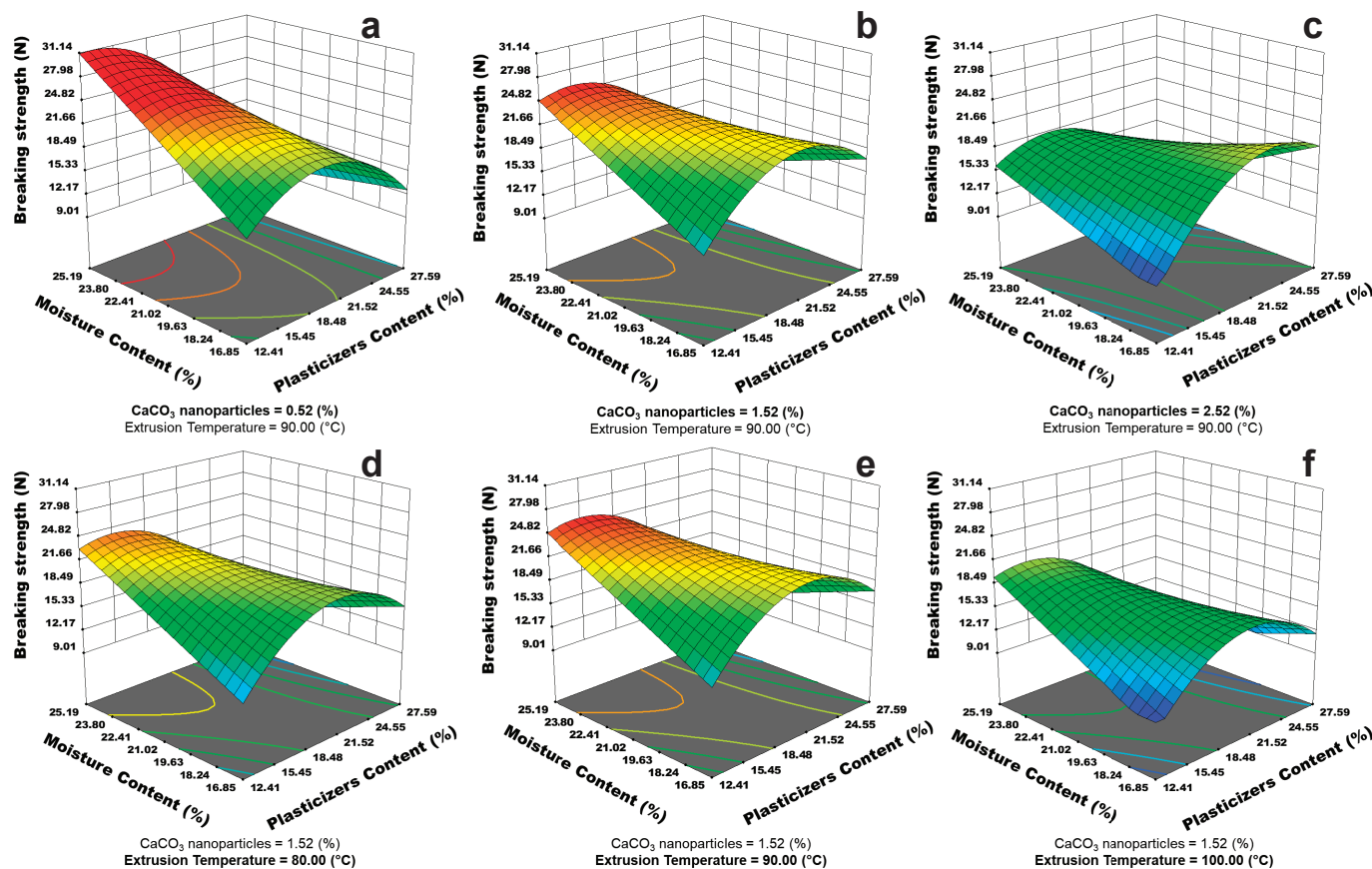


Figure 1. Effects of Calcium Carbonate Nanoparticles (a-c), Extrusion Temperature (d-f), Moisture Content and Plasticizers Content (a₂, b₂), on Breaking Strength, of edible films of corn starch.

Figura 1. Efecto de las Nanopartículas de Carbonato de Calcio (a-c), la Temperatura de Extrusión (d-f), el Contenido de Humedad y Contenido de Plastificantes (a₂, b₂), sobre la Resistencia a la Rotura, de películas comestibles de almidón de maíz.

bon adhesive tape. Samples were placed and covered for 10 min with a light gold layer, then submit for posterior analysis. A SEM (Philips®, Model XL30 ESEM, Eindhoven, Netherlands) was used, employing a secondary electron detector with 15 KV of acceleration. CCNP powder samples were placed on a carbon-coated copper grid and characterized in a Scanning Electron Field Emission Microscope (FEI, Nova NanoSEM 200, Shinagawa-ku, Tokio) with 15 kV acceleration and helix detector in low vacuum conditions.

Data Analysis

Quadratic model for predicting the optimal point was expressed according to the response surface methodology (RSM) The significance of the models was tested using variance analysis (F test). The significances of all terms in the polynomial were judged statistically by computing the F-value at a probability (p≤) of 0.001, 0.01 or 0.05. The regression coefficients were then used to make statistical calculations to generate dimensional and contour maps from the regression models. The response surface regression (RSREG) procedure was determined with Design Expert® Software Version 11.0 (Stat-Ease, Inc., Minn., U.S.A.). The microstructural characterization of the optimal treatment was analyzed by LSD Fisher means comparison (p ≤ 0.05) with StathGraphics Centurion XVIII.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization

Breaking Strength (BS)

BS showed a significant model of regression with R² values of 0.82, coefficient of variation CV = 12.10, and p of F= 0.0005 and showing lack of fit (Table 2). Also, the statistical analysis (Table 3) showed the CCNP and ET in their linear terms (p ≤ 0.05), were the factors that had the most significant effect on the BS. All quadratic terms had a significant effect, except MC. Only CCNP-PC and PC-MC interactions had a significant effect (p ≤ 0.01).

BS values ranged from 7.69 to 26 N (Table 1), values higher when compared with those reported by Zhong y Li (2014) (7.82 N), using films elaborated of kudzu starch with glycerol (53 % RH) and employing casting technique only. Figure 1(a-c) show the combined effect of PC, MC and CCNP. The BS increased by the effect of MC, as higher MC and BS. MC produced protective effect (gelatinization delaying), resulting in least damaged structures. However, the presence of plasticizers, which are introduced inside the starch chains, probably, generate more flexible and weak structures with lower BS (Gontard *et al.*, 1993), furthermore, the CCNP presence produce a plasticizing effect, though, there is an interaction with the plasticizers generating an increase on

Table 2. Analysis of variance for the responses of BS, D, WVP and WS of edible films of corn starch.

Tabla 2. Análisis de varianza para las respuestas de RR, D, PVA y SA de películas comestibles de almidón de maíz.

Response	R ² Adjusted	CV* (%)	F Value	p of F (model)	Lack of fit
BS	0.82	12.10	10.38	0.0005	0.0141
D	0.98	4.86	93.39	<0.0001	0.070
WVP	0.96	7.59	43.87	<0.0001	0.064
WS	0.98	2.11	112.29	<0.0001	0.487

*CV = Coefficient of Variation

BS= Breaking Strength, D= Deformation, WVP= Water Vapor Permeability, WS= Water Solubility.

Table 3. Regression coefficients of the second-order polynomial equations for the BS, D, WVP and WS responses of edible films of corn starch.

Tabla 3. Coeficientes de regresión de las ecuaciones polinomiales de segundo orden para las respuestas de RR, D, PVA y SA de películas comestibles de almidón de maíz.

	BS	D	WVP	WS	
Intercept	22.204	5.4752	11.348E-12	25.191	
Lineal	A	-1.7516**	-0.9815***	-00.695E-12	-0.401
	B	-1.9046**	0.9746***	04.088E-12***	2.800***
	C	-1.1072	0.8128***	03.718E-12***	3.020***
	D	0.7037	-0.7593***	00.741E-12	-0.701**
Quadratic	A ²	-1.427*	0.7574***	02.442E-12***	1.289***
	B ²	-3.610***	2.1190***	04.947E-12***	4.160***
	C ²	-2.735***	1.2205***	01.635E-12**	1.695***
	D ²	-	2.3731***	01.399E-12**	1.756***
Interactions	A*B	-	-	-02.212E-12**	-1.532***
	A*C	2.0770**	-0.2716	02.742E-12***	0.870**
	A*D	-1.4907	1.3304***	01.251E-12*	0.661*
	B*C	-	-0.9084***	-00.589E-12	1.264***
	B*D	-	1.6111***	02.482E-12***	1.849***
	C*D	-2.3546**	1.9093***	03.861E-12***	2.991***

* Significant at ≤0.05 level.

** Significant at ≤0.01 level.

*** Significant at ≤0.001 level

A= CaCO₃= Calcium Carbonate Nanoparticles, B= ET= Extrusion Temperature, C= PC= Plasticizers Content, D= MC= Moisture Content.

BS values, especially when the CCNP were higher. The effect of the plasticizers, agrees with Arvanitoyannis *et al.* (1996), who tested different plasticizers in starch-based films, and found that the BS decreased with higher plasticizers. On the other hand, Sun *et al.* (2014) made corn starch edible films with glycerol adding calcium carbonate nanoparticles. They reported that an increment in calcium carbonate nanoparticles concentration, was directly related to an increment in BS.

Figure 1(d-f) shows the temperature effect over BS. BS increased when temperature was ~90 °C, nevertheless, increment in temperature to ~100 °C, caused a decrease in the BS. These changes in BS may be due to the following: at low temperature could be present some amorphous areas (starch areas without gelatinized), generating less stiffness and causing weak film formation. On the other hand, with intermediate temperatures (~90 °C), structures are opened good enough to have an interaction with the components producing a low resistance; though, high temperatures increase the percent of gelatinized starch, being possible that the structure shows damage resulting in a BS decrease (Bhattacharya y Hanna, 1987). Yan *et al.* (2012) mentioned that high temperature and strong shear promoted the plasticizing efficiency and can cause the BS decrease.

Deformation (D)

The statistical analysis of the D data for EF showed a significant regression model (R² = 0.98, CV = 4.86, p of F < 0.0001) and did not show lack-of-fit (p ≥ 0.07) (Table 2). All linear and quadratic terms had a significant effect (p ≤ 0.001) (Table 3), as well as all interactions terms (p ≤ 0.001), with the exception of CCNP-ET and CCNP-PC. The D values in the present study ranged from 4.86 to 14.83 mm (Table 1), values slightly high than those reported by Zhong y Li (2014), who reported a value of 4.11 ± 0.02 mm in kudzu starch edible films. Also, compared with the amilomaize EF values (11.68 mm) of Calderón-Castro *et al.* (2018), are slightly higher. Figure 2 (a-c) shows PC, MC and CCNP combined effect, in which can be observed that at lowest MC values, a more rigid and less deformable EF were obtained. A low D value could kept structures without damage. On the other hand, the presence of plasticizers induced the formation of more flexible films, generating an increase in D and a decrease in BS. This effect is avoided by adding CCNP, as reported by Sun *et al.* (2014). Furthermore, high MC and PC values, showed an increment on D. This highest effect may be due to the interaction between the 3 components (MC-PC-CCNP), since, all these variables are having a plasticizing effect under these conditions.

Figure 2(d-f) shows the temperature effect on D. An increase in D was observed, perhaps caused by damaged structures. This damage produced fewer rigid structures and generated greater deformation. However, a low MC and an increased in PC, caused a decrease on D. This effect could be attributed to the increment in PC and temperature, which could generate structures that are physically weaker and therefore less deformable. These results are different than those reported by Calderón-Castro *et al.* (2018), who found no significant effect of extrusion temperature on deformation.

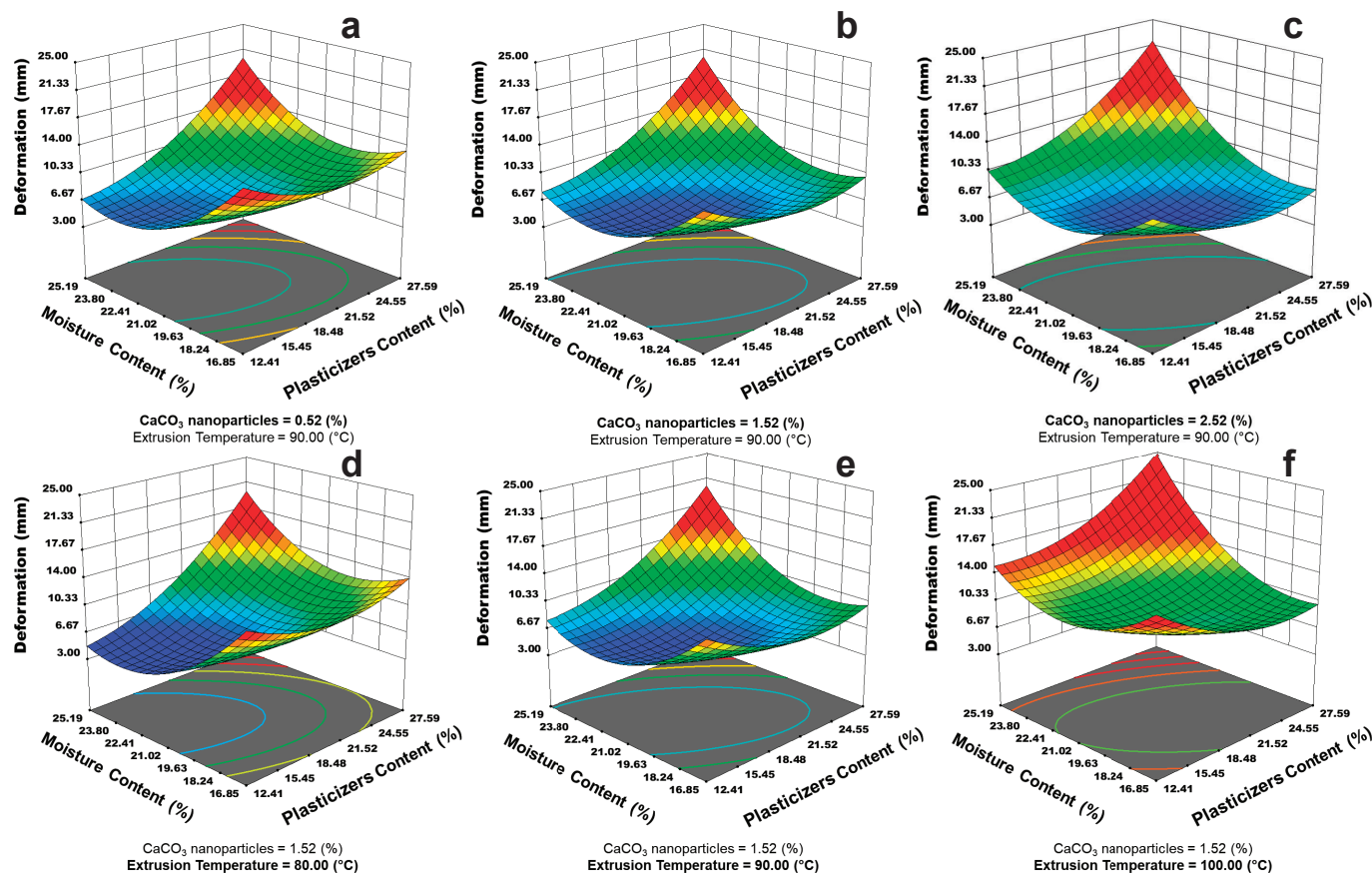


Figure 2. Effects of Calcium Carbonate Nanoparticles (a-c), Extrusion Temperature (d-f), Moisture Content and Plasticizers Content (a₂; b₂), on Deformation of edible films of corn starch.

Figura 2. Efecto de las Nanopartículas de Carbonato de Calcio (a-c), la Temperatura de Extrusión (d-f), el Contenido de Humedad y Contenido de Plastificantes (a₂; b₂), sobre la Deformación de películas comestibles de almidón de maíz.

Water Vapor Permeability (WVP)

The statistical analysis of WVP data for EF showed a significant regression model (RSM) $R^2 = 0.96$, $CV = 7.59$ and p of $F < 0.0001$, and did not show lack-of-fit ($p \geq 0.064$) (Table 2). The regression coefficients of the model show (Table 3) that only linear terms of CCNP and PC had significant effect ($p \leq 0.001$) as well as all quadratic terms ($p \leq 0.001$); regarding interactions terms all had significant effect ($p \leq 0.001$), except CCNP-MC ($p \leq 0.01$) and ET-PC (no significant). The WVP values in the present study range from 0.87 to $3.39 \times 10^{-11} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (Table 1), which are smaller than those reported by Younis y Zhao (2019), who reported minimum values at $3.3 \times 10^{-10} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, in films elaborated with pectin and chitosan by the casting method. Figure 3(a–c) shows the effect of PC, MC and CCNP, on the WVP response. It was mentioned before that, MC has a protective effect during the extrusion process, and it was observed that when MC is increased, it produces structures in the starch matrix which are more integrated and compact, reducing the WVP. Likewise, the presence of CCNP decreases the WVP, which could be due to the CCNP-generated polymer structure, more compact and therefore less permeable, and this is observed especially at low plasticizer content. Moreover, the incorporation of plasticizers, causes the opening of the polymer chains structure

generating an increase in the WVP. Dash *et al.* (2019) evaluated the effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles (0.5 % - 4 %) on different properties of sweet potato starch and lemon pectin-based EF. They found that WVP diminish with TiO₂ nanoparticles increased.

Figure 3(d–f) shows the temperature effect. An increment in temperature produce an increase of WVP. This could be due to a major gelatinization producing molecular disruption of starch chains, increasing the presence of short chains of starch structures, with higher water affinity. These results agrees with Fitch-Vargas *et al.* (2016) who reported changes in macromolecular matrix with the temperature and therefore an increase in WVP.

Wang *et al.* (2019) prepared corn starch bio-active EF packaging based on zein incorporated with orange-peel oil; they found WVP values of 2.15 to $6.62 \times 10^{-11} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (0.122 to 154 mm thickness film), similar to this study, with a difference in film thickness ($0.053 \pm 0.005 \text{ mm}$). Although permeability is independent of thickness, the permeance is related with the performance of the film when used as packaging materials is dependent of thickness (Buso-Ríos *et al.*, 2020), additionally, in case of EF marketed, less materials for their elaboration will be use.

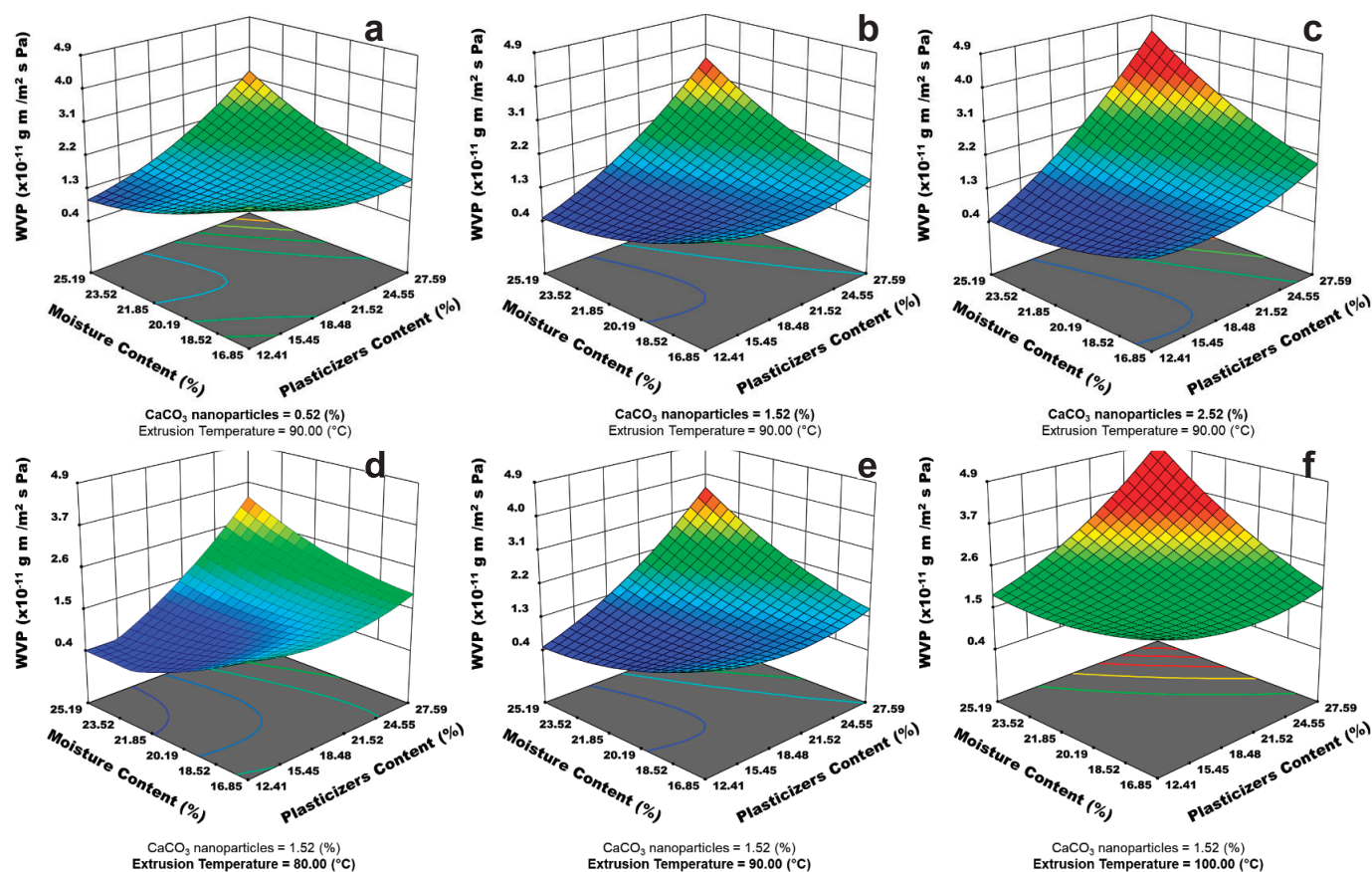


Figure 3. Effects of Calcium Carbonate Nanoparticles (a-c), Extrusion Temperature (d-f), Moisture Content and Plasticizers Content (a2; b2), on Water Vapor Permeability (WVP) of edible films of corn starch.

Figura 3. Efecto de las Nanopartículas de Carbonato de Calcio (a-c), la Temperatura de Extrusión (d-f), el Contenido de Humedad y el Contenido de Plastificantes (a2; b2), sobre la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA) de películas comestibles de almidón de maíz.

Water Solubility (WS)

WS showed a significant model of regression ($R^2 = 0.98$, $CV = 2.11$, and p of $F < 0.0001$) and did not show lack-of-fit ($p \geq 0.487$) (Table 2). The regression coefficients of the model show (Table 3) that all linear terms had significant effect ($p \leq 0.001$) except CCNP (no significant), all quadratic terms had significant effect ($p \leq 0.001$), as did all interactions terms ($p \leq 0.05$). The WS values in the present study range from 23.97 to 43.48 % (Table 1), which are smaller than those reported by Rostami y Esfahani (2019), who made EF with *Melissa officinalis* seed gum/Montmorillonite (5 %) / curcumin. They mentioned values higher than 45.39 % of WS and they were alike those reported by Mehyar y Han (2004) for rice (32.0 % soluble matter) and pea (44.4 % soluble matter) starches.

Figure 4 (a–c) shows the PC, MC and CCNP effect on WS. Higher WS values are related to high MC values, which could be due to the presence of more integral and compact structures, resulting in lower WS values. However, these values show an increase with the PC increment. The incorporation of these plasticizers could be generating structures more susceptible to solubilization, although, the presence of CCNP caused a decrease in solubility at low PC and MC. Similar results were reported by Dash *et al.* (2019), where they estimated WS between 24.27 to 20.92 % in edible films with TiO_2 nanoparticle added.

Figure 4 (d–f) shows the temperature effect on WS. In general, an increase in temperature produces higher solubility values, especially at high PC. This behavior agrees with that reported by Mercier y Feillet (1975) and Calderón-Castro *et al.* (2018).

Numerical Optimization

The best extrusion conditions were determined using the numerical optimization. The aim was to determine the best conditions of ET, CCNP, PC and MC to obtain EF with the highest BS and D values, as well as lowest WVP and WS values. According to the optimization results, the best process conditions were: CCNP = 0.77 %; ET = 84.23 °C, PC = 21.18 % and MC = 17 %. The following predicted values, corresponding to mathematical models, were obtained: BS = 20.56 N, D = 11.82 mm, WVP = $1.42 \times 10^{-11} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ and WS = 29.12 %.

The EF produced with optimal conditions was physicochemically characterized, having the following results: BS = $19.40 \pm 1.21 \text{ N}$, D = $6.98 \pm 0.73 \text{ mm}$, WVP = $1.77 \times 10^{-11} \pm 8.6 \times 10^{-13} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ and WS = $23.44 \pm 1.12 \%$; observing that experimental values to BS and WVP did not showed a significant difference ($P < 0.05$) regarding to the predicted values with the mathematical models. However, D and WS values were lower than the predicted values of the model used experimentally. The results found in the optimal EF,

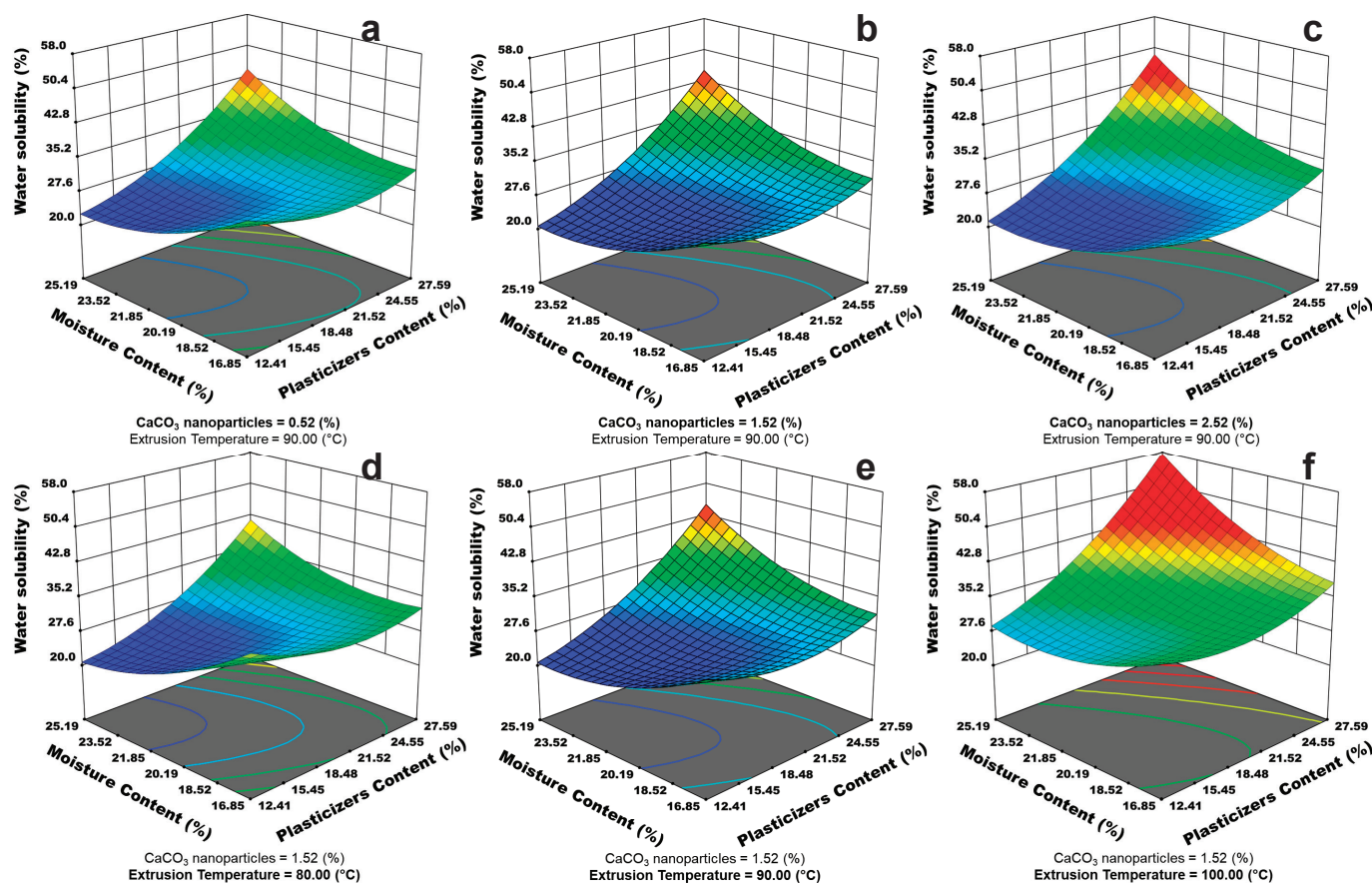


Figure 4. Effects of Calcium Carbonate Nanoparticles (a-c), Extrusion Temperature (d-f), Moisture Content and Plasticizers Content (a2; b2), on Water Solubility (WS) of edible films of corn starch.

Figura 4. Efecto de las Nanopartículas de Carbonato de Calcio (a-c), la Temperatura de Extrusión (d-f), el Contenido de Humedad y el Contenido de Plastificantes (a2; b2), sobre la Solubilidad en Agua (SA) de las películas comestibles de almidón de maíz.

showed to have a good fit with the model, finding the best conditions of extrusion process and CCNP, ET, PC and MC in the manufacture of EF with good mechanical and barrier properties.

Microstructural Analysis

X-Ray Diffraction

The loss effect of organized crystalline structure by extrusion process and casting technique on X-ray diffraction patterns is shown in Figure 5A. The Optimum Without Processing Mixture (OWPM) and Optimized Processing Mixture (OPM), showed a diffraction pattern type A, which is characteristic of cereals (predominant corn starch in mixture), and both, OWPM and OPM, with two main similar peaks, of $\approx 17.7^\circ$ and $\approx 22.8^\circ$ values 2θ , respectively. These results agree with those reported by Koo *et al.* (2010), who reported values 2θ of $\approx 17.18^\circ$ and $\approx 22.73^\circ$; also Guimarães *et al.* (2010) reported values 2θ of $\approx 17.7^\circ$ and $\approx 23.3^\circ$, all of them for corn starch. The patterns of OWPM and OPM were similar between them, meaning that the damage in the corn starch was low during the extrusion process. Finally, both OWPM and OPM produced a lightly fragmentation and gelatinization of the starch granules due to the interaction of ET, PC and MC. Oliveira *et al.* (2017) found changes in diffraction patterns caused by extrusion process from A-type in unprocessed, to

V-type in processed materials. Nevertheless, Optimized Edible Film (OEF) showed a V-type pattern with a main peak at 2θ of $\approx 20.7^\circ$, appearing an additional small peak at $2\theta \approx 30.4^\circ$ which can be related to the presence of calcium carbonate nanoparticles as described by Takabait *et al.* (2016). Zhong y Li (2014) reported that the peak 2θ at $\approx 20^\circ$ correspond to the single helical crystal structure of V-type pattern, and it could indicate the formation of amylose – glycerol complexes during processing.

Changes in X ray diffraction patterns affect relative crystallinity in materials processed. Figure 5B shows the relative crystallinity values of the materials studied. OWPM crystallinity was higher than the crystallinity of OPM, showing that extrusion process and plasticizers contributed lightly to starch granules fragmentation, reducing crystalline regions. Figure (5B) also shows that the OEF registered the lowest crystallinity value, which could be due to the casting technique, where starches gelatinization is complete, considerably reducing the crystalline regions. Furthermore, addition of plasticizers contributed to crystallinity decrease. Oliveira *et al.* (2017) studied the effect of temperature, feed moisture, and whole grain wheat flour on extrusion process severity and degree of starch transformation; they found that during extrusion, loss of crystallinity is caused by mechanical disruption of the molecular bonds within the extruder, due to the

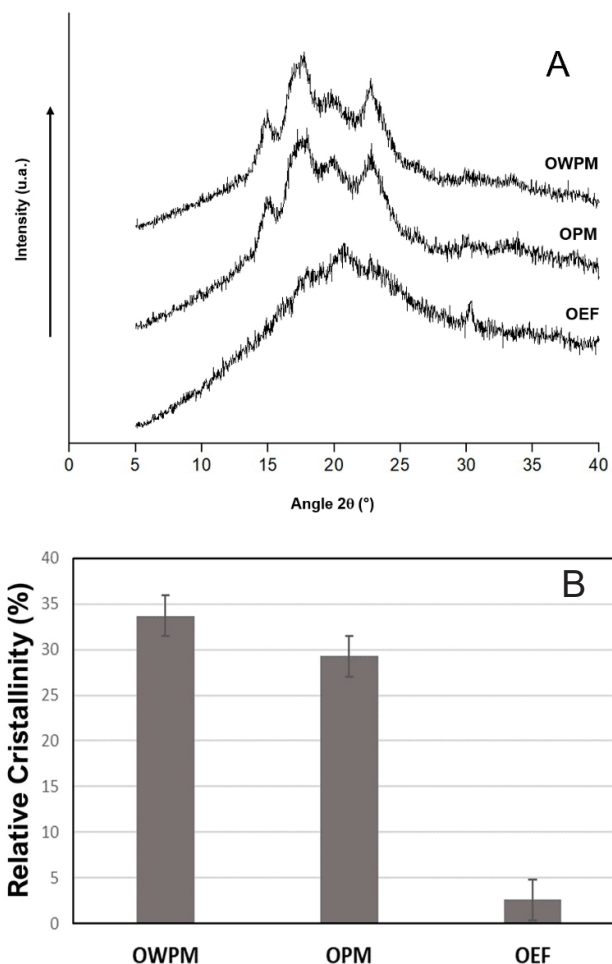


Figure 5. (A) X-ray diffractograms and (B) Relative crystallinity of Optimized Without Processing Mixture of Optimized Without Processing Mixture (OWPM), Optimized Processing Mixture (OPM) and Optimized Edible Film (OEF). Vertical bars indicate LSD= 4.48 ($p \leq 0.05$).

Figura 5. (A) Difractogramas de rayos X y (B) Cristalinidad Relativa de la Mezcla Optimizada sin Procesamiento (MOsP), Mezcla Optimizada Procesada (MOP) y Película Comestible Optimizada (PCO). Las barras verticales indican LSD= 4.48 ($p \leq 0.05$).

intense shear fields. Also, they found relative crystallinities around 25-34 % in raw materials, while processed material was 16-23 %. These results are consistent with those found in the present work.

Scanning Electron Microscopy

Figure 6A shows the CCNP. It is possible to appreciate spherical and semispherical forms with sizes of 26-99 nm. Figure 6B shows the OWPM microstructure. Corn starch granules shows spherical and polygonal shapes and diameters between 5 and 25 μm , similar to those reported by Koo *et al.* (2010) and Limón-Valenzuela *et al.* (2017). The image (6B) shows that the main component of the film forming mixture, corn starch, had not changes on its native composition when it was combined with a mixture of plasticizers; nevertheless, it is observed that the starch granules are agglomerated, which could be attributed to the plasticizer's presence.

Figure 6C shows the extrusion process effect on OPM sample. Starch granules presented an irregular shape, which are semi-open and semimolten; which may be a consequence of the processing effect. Likewise, starch agglomeration was observed indicating that some starch granules were intact after processing. This result provide that the conditions used (ET, PC and MC) in the extrusion process, could be generated by partial breaking of starch granules which allowed its fragmentation and pregelatinizing, maintaining its thermoplastic ability for future application in film forma-

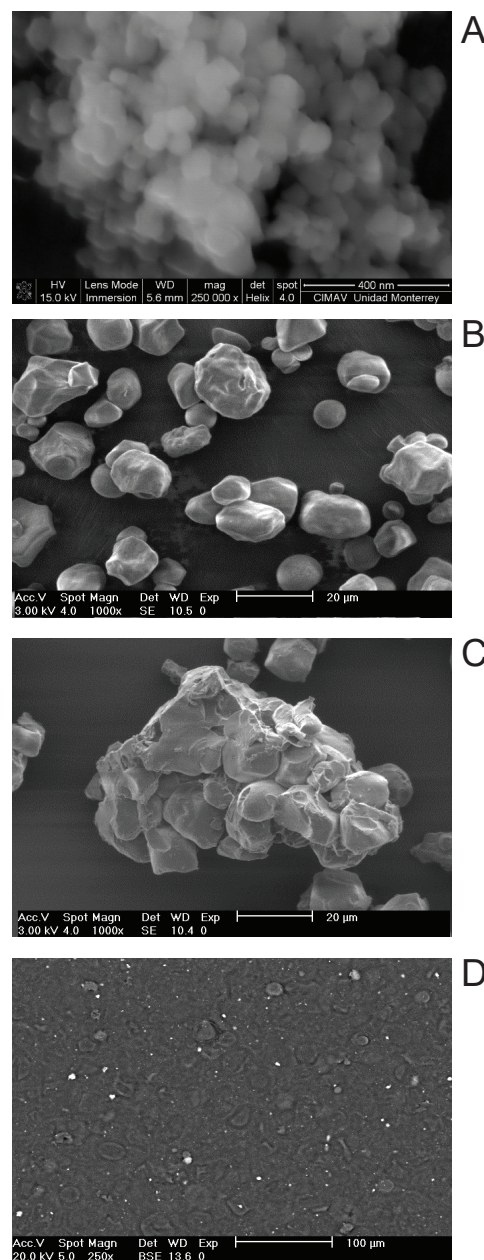


Figure 6. Scanning electron micrographs of: (A) CaCO₃ nanoparticles (B) Optimized Without Processing Mixture (OWPM), (C) Optimized Processing Mixture (OPM) and (D) Optimized Edible Film (OEF).

Figura 6. Microfotografías electrónicas de barrido de: (A) Nanopartículas de CaCO₃ (B) Mezcla Optimizada sin Procesamiento (MOsP), (C) Mezcla Optimizada Procesada (MOP) y (D) Película Comestible Optimizada (PCO).

tion. Aguilar-Palazuelos *et al.* (2007) observed that fragmentation of the granular structure and partial plasticization of the material took place during the preparation of corn starch, fiber and glycerol pellets employing the extrusion process; although, the pellets were suitable for its posterior processing by injection molding. Figure 6D shows the OEF. It is possible to observe an irregular surface with the presence of circular and semicircular forms, which are, probably, gelatinized starch granules, which were not destroyed by casting technique, probably it induces the decrement in WS values. Furthermore, it could be appreciated the presence of disperse white flashes with lower intensity, which are the calcium from CCNP embedded on this film, these brilliant points are absent in films without CCNP (data not shown).

CONCLUSIONS

Calcium carbonate nanoparticles improved the mechanical and barrier properties of EF, elaborated with extrusion-casting technologies, reinforcing, and plasticizing materials, which were enhanced by the presence of moisture content. The optimal combination allowed us to obtain edible films of corn starch with a mixture of plasticizers with greater BS and D as well as lower WVP and WS values, which could provide light fragmentation, damage and gelatinization of the starch granules, due to the interaction of ET, PC and MC, which were shown with X ray diffraction patterns and relative crystallinity changes in materials OWPM, OPM and OEF. SEM allowed to identify the size and shape of both nanoparticles and processed materials and films.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to CONACYT for providing financial support for the development of this work, as well as PROFAPI-UAS (PROFAPI2014/005) and to CINVESTAV-IPN Queretaro for the support in carrying out the necessary techniques for microstructural analysis.

REFERENCES

- Aguilar-Palazuelos, E., Martínez-Bustos, F., Jiménez-Arévalo, O. A., Galicia-García, T. y Delgado-Rangel, J. 2007. Potentiality of some natural fibres and native starch for making biodegradable materials. *In: KLENING, T. P. (ed.) Food Engineering Research Developments*. Nova Science Publishers, Inc.
- Aguilar-Palazuelos, E., Zazueta-Morales, J. d. J. y Martínez-Bustos, F. 2006. Preparation of high-quality protein-based extruded pellets expanded by microwave oven. *Cereal Chemistry*, 83(4): 363-369.
- Aguirre-Joya, J. A., Cerqueira, M. A., Ventura-Sobrevilla, J., Aguilar-Gonzalez, M. A., Carbó-Argibay, E., Castro, L. P. y Aguilar, C. N. 2019. Candelilla Wax-Based Coatings and Films: Functional and Physicochemical Characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 12(10): 1787-1797.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E. y Nakayama, A. 1996. Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol. Part 1. *Carbohydrate Polymers*, 31(4): 179-192.
- ASTM, A. S. F. T. A. M. 1995. Standard Test Method for Protrusion Puncture Resistance of Stretch Wrap Film. *Vol 14.02* West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Bhattacharya, M. y Hanna, M. 1987. Kinetics of starch gelatinization during extrusion cooking. *Journal of Food Science*, 52(3): 764-766.
- Buri, M., Gane, P. A. y Blum, R. V. 2012. Composites of inorganic and/or organic microparticles and nano-calcium carbonate particles. Google Patents.
- Buso-Ríos, O. I., Velázquez, G., Járquín-Enríquez, L. y Flores-Marínez, N. L. 2020. Efecto de la concentración de almidón y aceite esencial de clavo en las propiedades fisicoquímicas de las películas biodegradables. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(3): 1315-1326.
- Calderón-Castro, A., Vega-García, M. O., de Jesús Zazueta-Morales, J., Fitch-Vargas, P. R., Carrillo-López, A., Gutiérrez-Dorado, R., Limón-Valenzuela, V. y Aguilar-Palazuelos, E. 2018. Effect of extrusion process on the functional properties of high amylose corn starch edible films and its application in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3): 905-914.
- Chiumarelli, M. y Hubinger, M. D. 2014. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. *Food Hydrocolloids*, 38: 20-27.
- Dash, K. K., Ali, N. A., Das, D. y Mohanta, D. 2019. Thorough evaluation of sweet potato starch and lemon-waste pectin based-edible films with nano-titanium inclusions for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139: 449-458.
- Duncan, T. V. 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of colloid and interface science*, 363(1): 1-24.
- Fakhouri, F. M., Martelli, S. M., Caon, T., Velasco, J. I. y Mei, L. H. I. 2015. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 109: 57-64.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A. y Ibarz, A. 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6): 292-303.
- Fitch-Vargas, P. R., Aguilar-Palazuelos, E., de Jesús Zazueta-Morales, J., Vega-García, M. O., Valdez-Morales, J. E., Martínez-Bustos, F. y Jacobo-Valenzuela, N. 2016. Physicochemical and microstructural characterization of corn starch edible films obtained by a combination of extrusion technology and casting technique. *Journal of Food Science*, 81(9): E2224-E2232.
- Galindez, A., Daza, L. D., Homez-Jara, A., Eim, V. S. y Váquiro, H. A. 2019. Characterization of ulluco starch and its potential for use in edible films prepared at low drying temperature. *Carbohydrate Polymers*, 215: 143-150.
- Ghadam, A. G. J., Idrees, M. y Naqvi, S. A. H. 2012. Morphological and Thermal Properties of CaCO₃ Nanopowders Synthesized by Reverse Microemulsion Technique. *International Journal of Advances in Engineering Sciences*, 2(2): 1-6.
- Gómez, M., McDonough, C., Rooney, L. y Waniska, R. 1989. Changes in corn and sorghum during nixtamalization and tortilla baking. *Journal of Food Science*, 54(2): 330-336.

- Gontard, N., Guilbert, S. y Cuq, J. L. 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57(1): 190-195.
- Gontard, N., Guilbert, S. y Cuq, J. L. 1993. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58(1): 206-211.
- Guimarães, J., Wypych, F., Saul, C., Ramos, L. y Satyanarayana, K. 2010. Studies of the processing and characterization of corn starch and its composites with banana and sugarcane fibers from Brazil. *Carbohydrate Polymers*, 80(1): 130-138.
- Hu, L., Dong, P. y Zhen, G. 2009. Preparation of active CaCO₃ nanoparticles and mechanical properties of the composite materials. *Materials Letters*, 63(3-4): 373-375.
- Kim, H.-Y., Lamsal, B., Jane, J.-I. y Grewell, D. 2019. Sheet-extruded films from blends of hydroxypropylated and native corn starches, and their characterization. *Journal of Food Process Engineering*, n/a(n/a): e13216.
- Koo, S. H., Lee, K. Y. y Lee, H. G. 2010. Effect of cross-linking on the physicochemical and physiological properties of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 24(6): 619-625.
- Li, Y., Chen, S., Li, X., Wu, M. y Sun, J. 2015. Highly Transparent, Nanofiller-Reinforced Scratch-Resistant Polymeric Composite Films Capable of Healing Scratches. *ACS Nano*, 9(10): 10055-65.
- Limón-Valenzuela, V., Aguilar-Palazuelos, E., Zazueta-Morales, J. d. J. y Martínez-Bustos, F. 2017. Propiedades microestructurales y de formación de pasta de pellets extrudidos elaborados a partir de almidón de maíz enriquecidos con MCP y concentrado proteínico de leche. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(1): 193-205.
- Maftoonazad, N. y Ramaswamy, H. 2005. Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT-Food Science and Technology*, 38(6): 617-624.
- McHugh, T. H. 2000. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Food/Nahrung*, 44(3): 148-151.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R. y Krochta, J. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4): 899-903.
- Mehyar, G. F. y Han, J. H. 2004. Physical and Mechanical Properties of High-amylose Rice and Pea Starch Films as Affected by Relative Humidity and Plasticizer. *Journal of Food Science*, 69(9): E449-E454.
- Mercier, C. y Feillet, P. 1975. Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products. *Cereal Chemistry*, 52: 283-297.
- Oliveira, L. C., Barros, J. H. T., Rosell, C. M. y Steel, C. J. 2017. Physical and thermal properties and X-ray diffraction of corn flour systems as affected by whole grain wheat flour and extrusion conditions. *Starch - Stärke*, 69(9-10): 1600299.
- Rodríguez-Castellanos, W., Rodrigue, D., Martínez-Bustos, F., Jiménez-Arévalo, O. y Stevanovic, T. 2015. Production and characterization of gelatin-starch polymer matrix reinforced with cellulose fibers. *Polymers from Renewable Resources*, 6(3): 105-118.
- Roquemore, K. G. 1976. Hybrid Designs for Quadratic Response Surfaces. *Technometrics*, 18(4): 419-423.
- Rostami, H. y Esfahani, A. A. 2019. Development a smart edible nanocomposite based on mucilage of *Melissa officinalis* seed/montmorillonite (MMT)/curcumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141: 171-177.
- Sahebian, S., Zebarjad, S. M., Khaki, J. V. y Sajjadi, S. A. 2009. The effect of nano-sized calcium carbonate on thermodynamic parameters of HDPE. *Journal of Materials Processing Technology*, 209(3): 1310-1317.
- Sun, Q., Xi, T., Li, Y. y Xiong, L. 2014. Characterization of corn starch films reinforced with CaCO₃ nanoparticles. *PLoS One*, 9(9): e106727.
- Takabait, F., Mahtout, L., Pérez Villarejo, L., Carrasco Hurtado, B. y Sánchez Soto, P. J. 2016. Obtención de nanopartículas de carbonato de calcio a partir de precursores inorgánicos y sacarosa como aditivo con potencial utilización como biomaterial. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 55(5): 179-184.
- Teixeira, E. d. M., Curvelo, A. A. S., Corrêa, A. C., Marconcini, J. M., Glenn, G. M. y Mattoso, L. H. C. 2012. Properties of thermoplastic starch from cassava bagasse and cassava starch and their blends with poly (lactic acid). *Industrial Crops and Products*, 37(1): 61-68.
- Treviño-Garza, M. Z., García, S., del Socorro Flores-González, M. y Arévalo-Niño, K. 2015. Edible Active Coatings Based on Pectin, Pullulan, and Chitosan Increase Quality and Shelf Life of Strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Food Science*, 80(8): M1823-M1830.
- Wang, Y., Zhang, R., Ahmed, S., Qin, W. y Liu, Y. 2019. Preparation and Characterization of Corn Starch Bio-Active Edible Packaging Films Based on Zein Incorporated with Orange-Peel Oil. *Antioxidants (Basel)*, 8(9).
- Yan, Q., Hou, H., Guo, P. y Dong, H. 2012. Effects of extrusion and glycerol content on properties of oxidized and acetylated corn starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, 87(1): 707-712.
- Yildirim-Yalcin, M., Seker, M. y Sadikoglu, H. 2019. Development and characterization of edible films based on modified corn starch and grape juice. *Food Chemistry*, 292: 6-13.
- Younis, H. G. R. y Zhao, G. 2019. Physicochemical properties of the edible films from the blends of high methoxyl apple pectin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131: 1057-1066.
- Zhong, Y. y Li, Y. 2014. Effects of glycerol and storage relative humidity on the properties of kudzu starch-based edible films. *Starch - Stärke*, 66(5-6): 524-532.

Análisis del nicho climático de *Coryphantha durangensis* (Runge ex Schum.) Britton y Rose, 1923 e identificación de zonas potenciales para su conservación ante el cambio climático

Analysis of the climatic niche of *Coryphantha durangensis* (Runge ex Schum.) Britton y Rose, 1923, and identification of potential zones for its conservation in the face of climate change

Estrada-Rodríguez JL, Romero-Méndez U[†], Becerra-López JL*, Czaja Alexander, López-Martínez H, Reyes-Muñoz JL, Ávila-Rodríguez V, Cardoza-Martínez GF, Estrada-Arellano JR

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Universidad s/n, Frac. Filadelfia, C.P. 35010. Gómez Palacio, Durango.

RESUMEN

Coryphantha durangensis es una cactácea endémica que habita en México, en el centro del desierto Chihuahuense, y está considerada en la categoría de Protección Especial por la NOM-059-SEMARNAT-2010. Una de las mayores amenazas para esta especie es el cambio climático y pérdida de idoneidad climática para su presencia, en el presente estudio se evaluó el nicho climático de *C. durangensis* y se modeló la disponibilidad climática de esta especie mediante el algoritmo MaxEnt bajo condiciones del clima actual y futuro. Los resultados muestran una reducción en las zonas geográficas que presentan condiciones climáticamente adecuadas para la presencia de esta especie para el año 2050 y 2070. Sin embargo, se identificaron cuatro sitios que podrían ser propuestos como áreas de conservación para ésta y otras especies que cohabitan en estas zonas.

Palabras clave: idoneidad, clima, nicho, conservación.

ABSTRACT

Coryphantha durangensis is an endemic cactus that lives in Mexico, at the center of the Chihuahuan desert, and is considered a Special Protection by the NOM-059-SEMARNAT-2010. Climate change and habitat loss are the greatest threats to this species. In the present study, the climatic niche of *C. durangensis* was evaluated and the habitat availability of this species was modeled using the MaxEnt algorithm under current climate conditions and future. The results show a reduction in the geographical areas that present climatically suitable conditions for the presence of this species for the years 2050 and 2070. However, four sites were identified, which could be proposed as potential conservation areas for this and other species that cohabit in these zones.

Keywords: suitability, climate, niche, conservation.

INTRODUCCIÓN

En el contexto actual de la crisis de la biodiversidad, el impacto del cambio de uso de suelo sobre los ecosistemas y sobre las especies y el cambio climático deben constituir ejes centrales en la biología de la conservación (Rosenstock, 2011). El cambio climático es cualquier alteración del clima ocasionada por la variabilidad natural o la actividad humana

(Ramírez-Ojeda *et al.*, 2014) y se prevé afectará la distribución y presencia de especies del desierto, incluyendo las cactáceas (Cardoza-Martínez *et al.*, 2019). En este sentido, el análisis del nicho es de gran relevancia para pronosticar la viabilidad de las especies ante variaciones ambientales (Soberón y Nakamura, 2009), entendiendo el nicho como aquellas condiciones abióticas en las que una especie puede mantener poblaciones sin aporte migratorio (Grinnell, 1917).

Actualmente se ha utilizado el modelado de nicho ecológico para determinar la distribución geográfica de varias especies, para identificar los factores ambientales que las limitan, así como para obtener las métricas de solapamiento, expansión y divergencia de nichos ecológicos (Peterson *et al.*, 2011; Cuervo-Robayo *et al.*, 2017). Las técnicas de modelaje que requieren sólo datos de presencias han sido valiosas (Peterson *op. cit.*) y se han utilizado para modelar con diversos algoritmos como por ejemplo MaxEnt (Phillips *et al.*, 2005). En este algoritmo los modelos correlativos de la distribución de la especie y su ambiente se han modelado con una alta capacidad predictiva (Olden *et al.* 2008; Evans *et al.* 2013). El algoritmo MaxEnt es utilizado para la estimación de la densidad de probabilidad, utilizando un conjunto de muestras de una distribución objetivo en algún espacio dado, además de un conjunto de capas climáticas y restricciones conocidas en el área accesible de la especie en cuestión, donde se maximiza la probabilidad de las muestras (Duddik *et al.*, 2004). El resultado sería un modelo de su nicho ecológico, el cual puede ser proyectado al espacio geográfico para generar un mapa que represente la distribución potencial, este modelo asimismo puede ser proyectado bajo escenarios de cambio climático (PNUD, 2017).

Coryphantha durangensis es una cactácea endémica del estado de Durango y Coahuila, inventariada como preocupación menor dentro de la lista roja de la UICN (Ditch *et al.*, 2017) e inventariada como sujeta a Protección Especial (Pr) dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010. Ante el cambio climático global, la comprensión de cómo la idoneidad climática de una especie se pierde o se adapta a los entornos climáticos cambiantes es de gran relevancia para la detección temprana de especies vulnerables a estas variaciones ambientales (Hernández-Lambraño *et al.*, 2016). Con relación

*Autor para correspondencia: José Luis Becerra López
 Correo electrónico: biologo.jlbl@gmail.com

Recibido: 9 de marzo de 2022

Aceptado: 3 de agosto de 2022

a esto, es importante implementar metodologías que permitan cuantificar los cambios y diferencias de los nichos de las especies, tanto en el contexto climático como en su distribución geográfica, esto con la finalidad de medir el grado de vulnerabilidad del nicho climático de las especies ante las variaciones ambientales, ya sea derivadas del cambio climático global o perturbación antropogénica del hábitat (Broennimann *et al.*, 2012).

Actualmente, no existen estudios sobre el efecto que tendrá el cambio climático global en el nicho climático de *C. durangensis*. En este trabajo se evaluó la ocupación del nicho para esta especie, dentro de su área de distribución, y se analizó la disponibilidad climática bajo diferentes escenarios de cambio climático proyectados al futuro, esto con la finalidad de estimar los aumentos o las pérdidas de sitios con condiciones climáticas adecuadas para la presencia de la especie en estudio. Con la información generada se podrá fortalecer las estrategias de conservación de *C. durangensis*.

METODOLOGÍA

Datos de presencia

Se recopilaron registros de ocurrencias de la especie *C. durangensis* en toda su área de distribución conocida por medio de tres vías, 1) bases de datos disponibles en Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://www.gbif.org>), 2) bases de datos de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN; <http://www.iucnredlist.org>) y 3) datos de campo obtenidos por los autores. Fueron eliminados los registros redundantes y aquellos que presentaran poca confiabilidad, que no estuvieran dentro de la distribución conocida de la especie, obteniendo una base final de 28 datos (Figura 1).

Calibración del área M

Para elegir la extensión del área de estudio a modelar o área M, en el programa R Project (R version 3.1.3, R-Core-Team 2015) y utilizando la librería Wallace (Kass *et al.*, 2018), se definió el rango geográfico de estudio. Se tomó en consideración que este incluyera a todos los registros geográficos de presencia dentro de un polígono de 0.5 grados de extensión. De acuerdo a Cuervo-Robayo op. cit., a esta área calibrada con base a los puntos de presencia se le puede considerar como el área M, área de accesibilidad o movilidad y que para Barve *et al.* (2011) corresponde a una hipótesis sobre el área en la cual la especie tiene o ha tenido acceso para dispersarse. Asimismo, la identificación del área M se fundamenta en la premisa de que restringir las áreas de entrenamiento y transferencia de una especie a un acceso teóricamente accesible mejora en gran medida el rendimiento del modelo (Cooper y Soberón, 2017).

Posteriormente, a través de esta misma librería, Wallace (Kass *et al.*, 2018), se extrajeron las 19 capas del clima actual recortadas de acuerdo al área M identificada previamente. Estas capas climáticas contienen la información de las condiciones ambientales registradas desde 1970-2000 con una resolución espacial de 30 arc-segundos de grado,

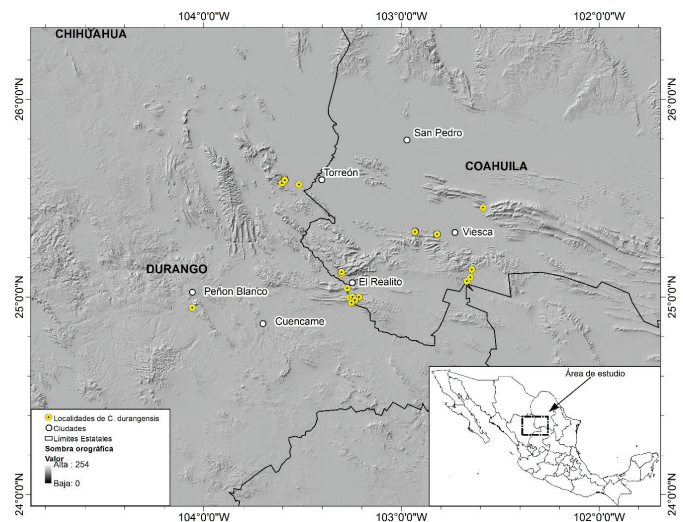


Figura 1. Mapa del área de estudio y localidades de *C. durangensis*.
Figure 1. Map of the study area and localities of *C. durangensis*.

disponibles en la plataforma de WorldClim (Fick y Hijmans, 2017.).

Selección de variables climáticas. Para la selección de las variables ambientales se realizó un análisis de correlación bivariada a través de NicheToolBox (Osorio *et al.*, 2016), esta es una aplicación que cuenta con herramientas para visualizar y analizar el nicho (Osorio op. cit.). Para el análisis de correlación primero se agregó información de las 19 variables ambientales del clima actual a los puntos de presencia de la especie y posteriormente se evaluó la relación entre las variables a través del análisis de correlación de Pearson. Este procedimiento permitió eliminar las variables que se encontraron correlacionadas ($r > 0.85$), lo cual disminuye la colinealidad entre variables reduciendo la información redundante (Guizado-Rodríguez *et al.*, 2012). Las variables seleccionadas fueron: Estacionalidad de la temperatura (bio4), Temperatura máxima del mes más cálido (bio5), Temperatura mínima del mes más frío (bio6), Precipitación del mes más seco (bio14), Estacionalidad de la Precipitación (bio15), Precipitación del trimestre más húmedo (bio16) y Precipitación del trimestre más seco (bio17).

Traslape de nicho climático

Para este análisis, el área de distribución de *C. durangensis* se clasificó en dos zonas de ocupación. La zona A considera a las poblaciones ubicadas en el estado de Durango, mientras que la zona B considera a las poblaciones ubicadas en el estado de Coahuila. Posteriormente, para determinar la equivalencia y similitud de nicho climático entre las dos zonas ocupadas por *C. durangensis*, con las variables retenidas en el análisis de correlación bivalente, en el programa R Project a través de la librería ecospat (Broennimann *et al.* (2018) se desarrolló un análisis de componentes principales (PCA) desde el enfoque propuesto por Broennimann *et al.* (2012). Este método compara condiciones climáticas disponibles para una especie dentro de un rango geográfico, determina

do a partir de sus ocurrencias observadas, y calcula el espacio climático disponible definido por los dos primeros ejes del PCA, además de corregir el sesgo de muestreo utilizando una función de densidad suavizada de Kernel (Broennimann *et al.*, 2012).

El traslape de nicho entre las dos zonas ocupadas por la especie se calculó utilizando la métrica D de Schoener, que varía de 0 (sin superposición entre nichos) a 1 (superposición completa) (Schoener, 1970). Las pruebas de equivalencia y similitud de nicho se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Broennimann *op. cit.* La prueba de equivalencia determina si los nichos de dos rangos geográficos son equivalentes (i. e. si la superposición de nicho es constante al reasignar aleatoriamente las ocurrencias de ambos nichos entre los dos rangos), para lo cual todas las ocurrencias se agrupan y se dividen aleatoriamente en dos conjuntos de datos, manteniendo el número de ocurrencias, como en los conjuntos de datos originales. Dicho proceso se repite 100 veces, esto para garantizar que la hipótesis nula pueda rechazarse con confianza; si el valor observado de D cae dentro de la densidad del 95% de los valores simulados, la hipótesis nula de equivalencia de nicho no puede ser rechazada.

Por otra parte, la prueba de similitud examina si la superposición entre nichos observados en dos rangos es diferente de la superposición entre el nicho observado en un rango y los nichos seleccionados al azar del otro rango. Dicha prueba también se basa en 100 repeticiones, si la superposición observada es superior al 95% de los valores simulados la especie ocupará entornos en sus dos rangos que son más similares entre sí de lo esperado al azar.

Modelado de nicho ecológico

Para modelar el nicho de *C. durangensis* se utilizó el algoritmo MaxEnt 3.3.3k (Philips *op. cit.*), el cual genera un gradiente de idoneidad climática que va de 0 (baja disponibilidad) a 1 (alta disponibilidad) (Elith *et al.*, 2011). MaxEnt es reconocido como uno de los algoritmos más robustos para realizar los modelos de nicho ecológico, porque puede ajustarlos a partir de un número reducido de datos; además, requiere únicamente información sobre la presencia de la especie y ha mostrado un buen desempeño en una amplia variedad de especies y regiones (Ballesteros-Barrera *et al.*, 2017).

Los parámetros de calibración utilizados para obtener dichos modelos fueron el multiplicador de regularización (regularization multiplier) = 1, el número máximo de puntos de fondo (maximum number of background points) = 10000, el límite de convergencia (convergence limit) = 0.00001 y el número máximo de repeticiones (maximum iterations) = 500. Otros parámetros fueron retenidos con sus valores por defecto. Los puntos de fondo fueron creados con 10000 puntos aleatorios, generados automáticamente por MaxEnt. Se eliminaron los registros duplicados de presencia por cada pixel y el formato de la grilla de salida se estableció como formato "logístico". Se utilizaron 100 réplicas para cada modelo o hasta llegar al límite de convergencia. Se trabajó con un

Betamultiplayer de 1, como lo aconseja Pearson *et al.* (2007), pues se trabajó con pocos puntos y a una escala local.

Se utilizaron las tres técnicas de remuestreo disponibles en MaxEnt: subsampling, crossvalidation y bootstrapping con 30% de prueba y 70% de entrenamiento. Posteriormente, los resultados se evaluaron considerando el área bajo la curva (AUC), donde el bootstrapping presentó los valores más altos de AUC en sus modelos y gráficas de omisión. Se utilizó el umbral empírico calculado por MaxEnt: Minimum training presence de cada modelo, para minimizar los errores de omisión y comisión, generando así los mapas de presencia-ausencia (Urbani *et al.*, 2017).

La información obtenida de los modelos calibrados para el área M de la especie en estudio fue proyectada considerando las variables ambientales retenidas en el análisis de correlación bivariada. Asimismo, esta calibración fue proyectada a los escenarios de cambio climático propuestos para los años 2050 (2041-2060) y 2070 (2061-2080), considerando la concentración de gases de efecto invernadero RCP 8.5; correspondiente a los Modelos de circulación Global CCSM4 de datos IPPC5 (CMIP5) a 30 arcosegundos de resolución (Becerra-López, *et al.*, 2020). El Modelo del Sistema Climático Comunitario (CCSM), hoy referido al modelo CESM1, es un modelo climático acoplado para simular el sistema climático de la Tierra. Está compuesto por cuatro modelos separados simulando a la vez la atmósfera terrestre, el océano, la superficie terrestre y el hielo marino, y un componente acoplador central. El CCSM permite llevar a cabo investigaciones fundamentales sobre los estados climáticos del pasado, presente y futuro de la Tierra (<http://www.cesm.ucar.edu/models/ccsm4.0/>). Para determinar la precisión de los modelos, en diferentes épocas, se tomó como referencia el AUC.

La importancia de cada variable bioclimática en la distribución observada de *C. durangensis* se evaluó de acuerdo a la importancia relativa de cada variable, la cual se obtuvo sumando el porcentaje de aporte (PC) y la importancia de la permutación (IP), evaluado por MaxEnt, y el resultado se dividió entre dos (contribución promedio (PC + IP)/2) (Anadón *et al.*, 2015).

Como último paso, se midió la idoneidad climática dentro del Área M en las condiciones climáticas actuales y futuras. También, se identificó la vulnerabilidad de la idoneidad climática de *C. durangensis* al cambio climático, utilizando el siguiente análisis de tasa de cambio: % de cambio = $[(S1-S0) / S0] * 100$, donde S0 es la superficie total del área de estudio, según el escenario base, y S1 es la superficie total ocupada en el área de estudio bajo condiciones de cambio (Gutiérrez y Trejo, 2014).

RESULTADOS

Traslape de nicho climático

En análisis de equivalencia entre la zona A y zona B con presencia de *C. durangensis* muestra un estadístico D = 0.033 y un valor de $p > 0.05$ (Figura 2). Por otra parte, el análisis de similitud de dos colas indica que al comparar la zona A con zona B, el estadístico D presenta un valor de 0.033

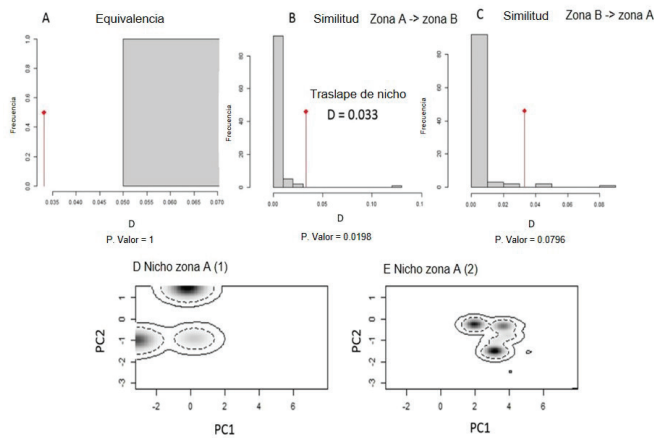


Figura 2. En el panel superior se muestran las gráficas del análisis de equivalencia de nicho (A) y la prueba de similitud de ambos nichos ecológicos (B y C) en ambos sentidos. En el panel inferior se muestran las figuras D y E, las cuales corresponden al análisis de densidad suavizada de Kernel que cuantifica el solapamiento del nicho ecológico. La línea punteada representa el 50% y la línea continua representa el 100% de la densidad.

Figure 2. The upper panel shows the graphs of niche equivalence analysis (A) and the similarity test of both ecological niches (B and C) in both directions. The lower panel shows figures D and E, which correspond to Kernel's smoothed density analysis that quantifies the ecological niche overlap. The dotted line represents 50% and the solid line represents 100% density.

y un valor P de 0.0198, mientras que al comparar la zona B con zona A, la similitud del estadístico D presenta un valor de 0.033 y un valor P de 0.0796 (Figura 2).

Modelado de nicho ecológico. Tanto para los modelos de nicho del clima actual como para los escenarios climáticos futuros, los valores del AUC fueron mayores o iguales a 0.95, lo que indica que los modelos presentan un buen rendimiento.

De acuerdo a los resultados de MaxEnt, bajo condiciones del clima actual las variables bio4, bio15 y bio16 son las que mayor contribución presentan en la generación de zonas climáticamente idóneas para la presencia de *C. durangensis*. En el modelo generado para el año 2050, las variables que mayor contribución presentaron fueron elevación, bio4 y bio16. Mientras que para el modelo generado para el año 2070, las variables de mayor contribución fueron bio15, elevación y bio16. El resto de las variables no presentó una contribución relevante en la identificación de zonas climáticamente adecuadas para la especie (Tabla 1).

La idoneidad climática para la especie en estudio indica un área de 5316.912 km² bajo condiciones del clima actual. Sin embargo, las proyecciones realizadas para el año 2050 y 2070 sugieren que la idoneidad climática de esta especie podrá disminuir a 2299.013 km² y 802.499 km², respectivamente (Tabla 2). Estos resultados indican que entre el año 2050 y 2070 podría ocurrir una pérdida de idoneidad climática para la especie en estudio de entre el 56.7 % y 84.9 %, respectivamente. Sin embargo, la inspección de las áreas de cambio muestra que las zonas llamadas Sierra de Lerdo, El Realito, Sierra de Viesca y Sierra de Parras presentan condiciones climáticamente adecuadas para la presencia de *C. durangensis*, que se mantienen a través de los diferentes escenarios climáticos utilizados en este estudio (Figura 3).

Tabla 1. Se muestran las variables que mayor contribución presentaron en la generación de los modelos de nicho climático bajo condiciones del clima actual y futuro (2050 y 2070). Estacionalidad de la temperatura (bio4), Estacionalidad de la precipitación (bio15), Precipitación del trimestre más húmedo (bio16) y elevación (ELEV).

Table 1. Variables that presented the greatest contribution in the generation of climate niche models under current and future climate conditions (2050 and 2070) are shown. Seasonal Temperature (bio4), Seasonal Precipitation (bio15), Precipitation of wettest quarter (bio16), and the elevation (ELEV).

PRESENTE			
Variable	Contribución	Permutación	Promedio
bio16	28.6	57.3	42.95
bio4	21.6	5.1	13.35
bio15	19.6	22.7	21.15
FUTURO 2050			
Variable	Contribución	Permutación	Promedio
ELEV	44.7	19.9	32.3
bio4	28.4	19.1	23.75
bio16	9.0	48.9	28.95
FUTURO 2070			
Variable	Contribución	Permutación	Promedio
ELEV	39.4	2.3	20.85
bio16	17.2	54.5	35.85
bio15	11.3	11.3	11.3

Tabla 2. Cambios en la superficie de disponibilidad climática de los modelos de nicho de *Coryphantha durangensis* para el año 2050 y 2070 a través del escenario climático RCP 8.5, superficie medida en Km².

Table 2. Changes in the climatic availability area of the niche models of *Coryphantha durangensis* for the year 2050 and 2070 through the RCP 8.5 climate scenario, area measured in Km².

Modelo	Área en Km ²	Cambio en %
Presente	5316.912	0
Futuro 2050	2299.013	-56.76
Futuro 2070	802.499	-84.90

DISCUSIÓN

El análisis de equivalencia entre la zona A y zona B con presencia de *C. durangensis* muestra un estadístico $D = 0.033$, $p > 0.05$. Al respecto, Warren *et al.* (2008) plantea que la hipótesis nula de equivalencia, la cual indica para nuestro caso de estudio que las zonas ocupadas por *C. durangensis* no son ecológicamente distintas, se aceptará siempre y cuando el valor de significancia obtenido durante este análisis sea superior a 0.05. En contraste, si el valor de significancia obtenido es menor a 0.05 se rechazará la hipótesis nula y se aceptará la hipótesis alterna. Con base en lo mencionado, nuestros resultados sugieren que entre las dos zonas con presencia de *C. durangensis* no existe una equivalencia climática.

Por otra parte, los resultados del análisis de similitud muestran valores de significancia de 0.0198 al comparar la zona A con la zona B y una significancia de 0.0796 al comparar la zona B con la zona A. Al respecto, Broennimann *et al.* (2012) mencionan que la similitud de nicho se refiere a cómo

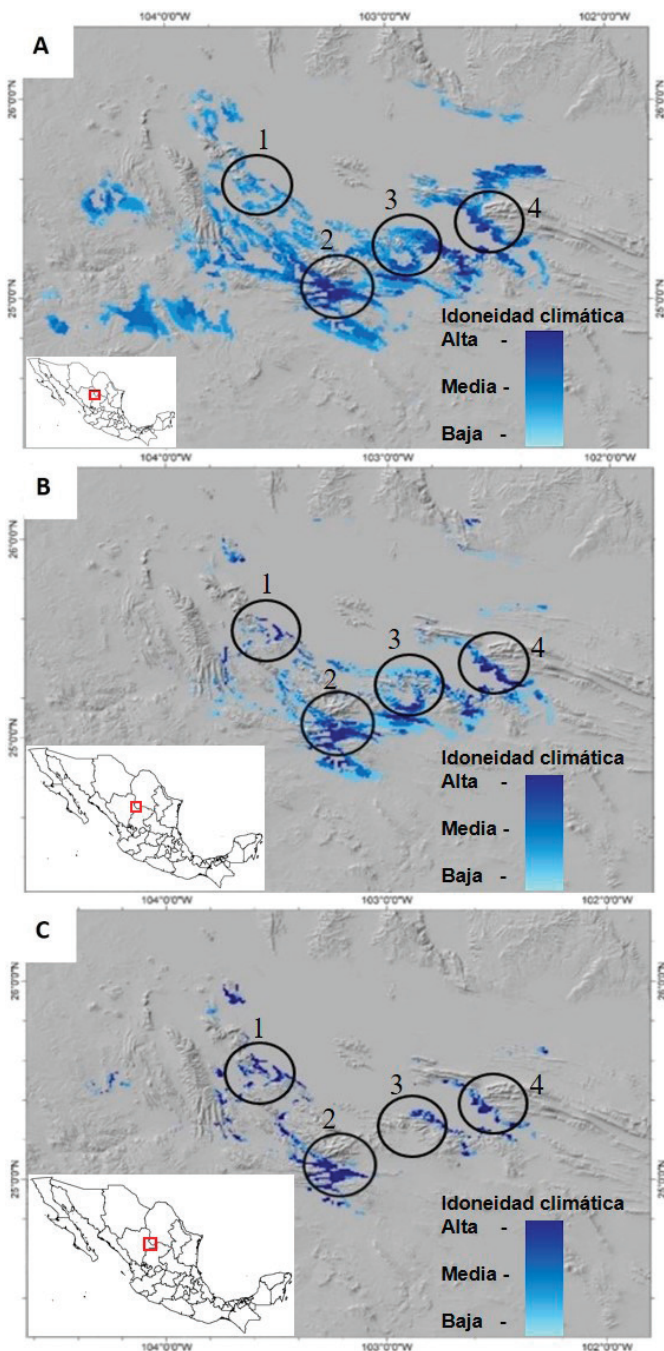


Figura 3. A = modelo clima actual (1960-1990); B = modelo del futuro 2050 (2041-2060); C = modelo del futuro 2070 (2061-2080). Los círculos negros representan zonas donde permanecen áreas de máxima idoneidad y podrían considerarse para posibles áreas de conservación de esta especie: 1. Sierra de Lerdo, 2. El Realito, 3. Sierra de Viesca y 4. Sierra de Parras.

Figure 3. A = current climate model (1960-1990); B = climate model projection for 2050 (2041-2060); C = climate model projection for 2070 (2061-2080). Black circles represent zones with remaining areas of maximum suitability which could be considered for possible conservation areas for this species: 1. Sierra de Lerdo, 2. El Realito, 3. Sierra de Viesca and 4. Sierra de Parras.

el entorno climático de un rango geográfico ocupado por una especie predice a otro rango geográfico ocupado por la especie, esto mejor de lo que se esperaría por azar bajo un modelo nulo específico. Esta prueba de similitud es muy estricta ya que considera que dos rangos geográficos ocupados por la especie serán similares solo si la prueba presenta valores estadísticos significativos en ambas direcciones. Bajo este criterio, los resultados de la prueba de similitud permiten rechazar la hipótesis nula de similitud climática propuesta por Broennimann *et al.* (2012). Por lo que es posible señalar que las dos zonas con presencia de *C. durangensis* no son climáticamente similares, en consecuencia es posible mencionar que está ocupando dos zonas climáticamente distintas.

En este sentido, se ha mencionado que la ocupación de diferentes nichos por una especie podrá tener importantes implicaciones para el entendimiento de su vulnerabilidad ante los efectos del cambio climático (Wiens *et al.*, 2005). Se ha señalado que aquellas especies que son capaces de ocupar entornos ambientales contrastantes podrán verse menos afectadas por la variación local en la disponibilidad de recursos y las condiciones ambientales, porque pueden persistir en varios tipos de hábitats (Brown, 1984). En consecuencia, bajo esta perspectiva, se esperaría que las especies con nichos más amplios puedan ser menos vulnerables a la variación ambiental abrupta bajo el cambio climático antropogénico (Johnson, 1998).

Por otra parte, existe evidencia sustancial que respalda la teoría de que las especies endémicas y con limitada capacidad de dispersión o distribución fragmentada son más propensas a la extinción (Thomas *et al.*, 2004; Malcolm *et al.*, 2006). Asimismo, se ha reportado que los nichos reducidos impulsan el riesgo de extinción de una especie ante las variaciones del cambio climático; por ejemplo, esto se ha demostrado en peces (Munday, 2004), murciélagos (Boyles y Storm, 2007), aves (Seoane y Carrascal, 2008), anfibios (Botts *et al.*, 2013) y plantas (Ozinga *et al.*, 2013).

Con relación a lo anterior, la hipótesis que sugiere que aquellas especies que ocupan diferentes nichos son menos vulnerables a las variaciones climáticas ha sido planteada, en la mayoría de los casos, para especies que presentan una amplia distribución geográfica (Baltzer *et al.*, 2007). Por lo que surge la pregunta de si ¿Esta hipótesis puede ser aplicada en aquellas especies de distribución restringida pero que ocupan zonas climáticas no similares? Al respecto, los resultados obtenidos en el presente estudio para *C. durangensis* indican que la disponibilidad de hábitat proyectada para el año 2050 podrá disminuir un 56.7 % y para el 2070 se estima una reducción de un 84.9 %. Estas evidencias sugieren que la ocupación de dos nichos por una misma especie puede ocurrir tanto en especies con amplia distribución, como en aquellas especies con distribución restringida. Sin embargo, en nuestro caso de estudio, la ocupación de más de un nicho climático en una especie con distribución restringida no disminuye el riesgo de extinción ante las variaciones ambientales ocasionadas por el cambio climático.

Por otra parte, se ha mencionado que las zonas geográficas que mantienen condiciones ambientales óptimas para una especie (bajo diferentes escenarios de cambio climático) pueden ser consideradas como áreas prioritarias para su conservación (Becerra-López *et al.*, 2017). Al respecto, los modelos de idoneidad climática generados en este estudio, indican que las zonas identificadas como El Realito (Durango), Sierra de Lerdo (Durango), Sierra de Parras (Coahuila) y Sierra de Viesca (Coahuila) mantendrán la idoneidad de climática óptima en cuanto a las variables Estacionalidad de la temperatura, Estacionalidad de la Precipitación y Precipitación del trimestre más húmedo, para la presencia de *C. durangensis* a través de las variaciones climáticas proyectadas para esta zona geográfica a largo plazo, por lo cual, pueden ser consideradas como sitios prioritarios para la conservación de *C. durangensis*.

CONCLUSIONES

En conclusión, se sugiere que independientemente de que *C. durangensis* pueda estar utilizando dos entornos climáticos distintos dentro de su área de distribución actual, este no es un factor que le permita disminuir su vulnerabilidad ante las variaciones ambientales generadas por el cambio climático global. Ante esto, es necesario promover la conservación y protección de aquellos entornos geográficos que mantendrán las condiciones climáticas óptimas para la persistencia de esta especie en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Esta obra científica es dedicada a la memoria del Dr. Ulises Romero Méndez quien por décadas contribuyó en la generación de conocimiento científico enfocado a la conservación de los ecosistemas de México. Su legado permanecerá vivo a través de sus alumnos y obras científicas, descanse en paz maestro uly y gracias por todo!

REFERENCIAS

- Anadón, J.D.; Graciá, E.; Botella, F.; Giménez, A.; Fahd, S. and Fritz, U. Individualistic Response to Past Climate Changes: Niche Differentiation Promotes Diverging Quaternary Range Dynamics in the Subspecies of *Testudo Graeca*. *Ecography* 2015. 38, 956-966.
- Ballesteros-Barrera, C., Aguilar-Romero, O., Zarate-Hernández, R. y Ballesteros-Tapia, L. 2017. Distribución geográfica y conservación de nueve especies del género *Ferocactus* (Cactaceae) en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* [Consultado: 7 de octubre de 2018] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61051413005>> ISSN 0187-7380.
- Baltzer, J.L., Davies, S.J., Noor, N.S.M., Kassim, A.R. y LaFrankie, J.V. 2007. Geographical distributions in tropical trees: Can geographical range predict performance and habitat association in co-occurring tree species? *Journal of Biogeography*. 34: 1916-1926.
- Barve, N., Barve, V., Jiménez-Valverde, A., Lira-Noriega, A., Maher, S. P., Peterson, A. T., ... y Villalobos, F. 2011. The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. *Ecological Modelling*. 222 (11): 1810-1819.
- Botts, E. A., Erasmus, B. F. N. y Alexander, G. J. 2013. Small range size and narrow niche breadth predict range contractions in South African frogs. *Global Ecology and Biogeography*. 22: 567-576. <https://doi.org/10.1111/geb.12027>.
- Cardoza-Martínez, G. F., Becerra-López, J. L., Esparza-Estrada, C. E., Estrada-Rodríguez, J. L., Czaja, A., Ehsan, M., ... y Romero-Méndez, U. 2019. Shifts in climatic niche occupation in *Astrophytum coahuilense* (H. Möller) Kayser and its potential distribution in Mexico. *Sustainability*. 11 (4): 1138.
- Becerra-López, J. L., Ramírez-Bautista, A., Romero-Méndez, U., Pavón, N. P., y Sánchez-Rojas, G. 2017. Effect of climate change on halophytic grasslands loss and its impact in the viability of *Gopherus flavomarginatus*. *Nature Conservation*. 21: 39.
- Becerra-López, J. L., Rosales-Serna, R., Ehsan, M., Becerra-López, J. S., Czaja, A., Estrada-Rodríguez, J. L., Romero-Méndez, U., Santana-Espinosa, S., Reyes-Rodríguez, C.M., Ríos-Saucedo, J.C. y Domínguez-Martínez, P. A. 2020. Climatic Change and Habitat Availability for Three Sotol Species in México: A Vision towards Their Sustainable Use. *Sustainability*, 12(8), 3455.
- Boyles, J. G. y Storm, J. J. 2007. The perils of picky eating: dietary breadth is related to extinction risk in insectivorous bats. *PLoS ONE*. 2: e672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000672>.
- Broennimann, O., Fitzpatrick, M.C., Pearman, P.B., Petitpierre, B., Pellissier, L., Yoccoz, N.G., Thuiller, W., Fortin, M.J., Randin, C., Zimmermann, N.E., Graham, C.H. y Guisan, A. 2012. Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Global Ecology and Biogeography*. 21: 481-497.
- Broennimann, O., Petitpierre, B., Randin, C., Engler, R., Di Cola, V., Breiner, F., D'Amen, M., Pellissier, L., Pottier, J., ... y Pio, D. *Ecospat: Spatial Ecology: Miscellaneous Methods*. R Package Version 1.1/2015. Available online: <http://CRAN.R-project.org/package=ecospat> (accessed on 30 November 2018).
- Brown, J.H. 1984. On the relationship between abundance and distribution of species. *The American Naturalist*. 124: 255-279.
- Cooper, J.C. y Soberón, J. 2018. Creating individual accessible area hypotheses improves stacked species distribution model performance. *Global Ecology and Biogeography*. 27: 156-165. DOI: 10.1111/geb.12678.
- Cuervo-Robayo, A. P., Escobar, L.E., Osorio-Olvera, L. A., Nori, J., Varela, S., Martínez-Meyer, E., Velásquez-Tibata, J., Rodríguez-Soto, C., Munguía, M., Castaneda-Alvarez, N.P., Lira-Noriega, A., Soley-Guardia, M., Serra-Díaz, J.M. y Townsend Peterson, A. 2017. Introducción a los Análisis Espaciales con Énfasis en Modelos de Nicho Ecológico. *Biodiversity Informatics*. ISSN 15469735. [Consultado: 23 de mayo 2018] Available at: <<https://journals.ku.edu/jbi/article/view/6507/6016>>. DOI: <https://doi.org/10.17161/bi.v12i0.6507>.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. 2019. MODIFICACIÓN del Anexo Normativo III, Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, publicada el 30 de diciembre de 2010.
- Duddik, M., Phillips, S.J. y Schapire, R.E. 2004. Performance Guarantees for Regularized Maximum Entropy Density Estimation. Appearing in *Proceedings of the 17th Annual Conference on Computational Learning Theory*. Berlin.
- Elith, J., Phillips, S. J., Hastie, T., Dudík, M., Chee, Y. E. y Yates, C. J. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*. 17 (1): 43-57.

- Evans, M. R., V. Grimm, K., Johst, T., Knuuttila, R., de Langhe, C. M., Lessells, M., Merz, M. A., O'Malley, S. H., Orzack, M., Weisberg, D. J., Wilkinson, O., Wolkenhauer, T. G. y Benton, T. G. 2013. Do simple models lead to generality in ecology? *Trends in Ecology & Evolution*. 28: 578-583.
- Fick, S.E. y R.J. Hijmans. 2017. WorldClim 2: new 1km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 37 (12): 4302-4315.
- Guizado-Rodríguez, M. A., Ballesteros-Barrera, C., Casas-Andreu, G., Barradas-Miranda, V.L., Tellez-Valdes, O. y Salgado-Ugarte, I.H. 2012. The impact of global warming on the range distribution of different climatic groups of *Aspidoscelis costata costata*. *Zoological Science*. 29 (12): 934-843.
- Gutiérrez I. y Trejo, E. 2014. Efecto del cambio climático en la distribución potencial de cinco especies arbóreas de bosque templado en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 179-188. <https://doi.org/10.7550/rmb.37737>
- Grinnell, J. 1917. The niche-relationships of the California Thrasher. *The Auk*, 34(4), 427-433.
- Hernández-Lambraño, R. E., González-Moreno, P. y Sánchez-Agudo, J. Á. 2017. Towards the top: niche expansion of *Taraxacum officinale* and *Ulex europaeus* in mountain regions of South America. *Austral Ecology*. 42 (5): 577-589. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019
- Johnson, C. 1998. Species extinction and the relationship between distribution and abundance. *Nature*. 394: 272-274.
- Kass, J. M., Vilela, B., Aiello-Lammens, M. E., Muscarella, R., Merow, C. y Anderson, R. P. 2018. Wallace: A flexible platform for reproducible modeling of species niches and distributions built for community expansion. *Methods in Ecology and Evolution*. 9 (4): 1151-1156. doi:10.1111/2041-210x.12945.
- Malcolm, J. R., Liu, C., Neilson, R. P., Hansen, L. y Hannah, L. E. E. 2006. Global warming and extinctions of endemic species from biodiversity hotspots. *Conservation Biology*. 20 (2): 538-548.
- Munday, P. L. 2004. Habitat loss, resource specialization, and extinction on coral reefs. *Global Change Biology*. 10: 1642-1647. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00839.x>.
- Olden, J. D., Lawler, J. J. y Poff, N.L. 2008. Machine learning methods without tears: A primer for ecologists. *The Quarterly Review of Biology*. 83: 171-193.
- Osorio-Olvera L., Barve, V., Barve, N. y Soberón, J. 2016. Nichetoolbox: From getting biodiversity data to evaluating species distribution models in a friendly GUI environment. R package version 0.1.6.0. <https://github.com/luismurao/nichetoolbox>.
- Ozinga, W. A., Colles, A., Bartish, I. V., Hennion, F., Hennekens, S. M., Pavoine, S., Poschlod, P., Hermant, M., Schaminée, J. H. J. y Prinzing, A. 2013. Specialists leave fewer descendants within a region than generalists. *Global Ecology and Biogeography*. 22: 213-222. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2012.00792.x>.
- Pearson, R., Raxworthy C. J., Nakamura M. y Peterson A. T. 2007. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography*. 34: 102-117. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2699.2006.01594.x/full>.
- Peterson, A. T., Soberón, J., Pearson, R. G., Anderson, R. P., Martínez-Meyer, E., Nakamura, M. y Araújo, M. B. 2011. *Ecological niches and geographic distributions*. Princeton: Princeton University Press.
- Phillips, S. J. 2005. A brief tutorial on MaxEnt. *AT y T Research*. 190 (4): 231-259.
- PNUD (Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo). 2017. Modelación de la distribución potencial actual y futura de las especies invasoras de mayor riesgo para México. Elaborado en el marco del proyecto GEF-PNUD 089333 "Aumentar las capacidades de México para manejar especies exóticas invasoras a través de la implementación de la Estrategia Nacional de Especies Invasoras". Martínez-Meyer, E., A.P. Cuervo-Robayo, G.A. Ortiz-Haro y L.A. Osorio-Olvera. Instituto de Biología, UNAM.
- Ramírez-Ojeda, J.A., Ruiz-Corral, C., Pérez-Mendoza, R., Villavicencio-García, S., Mena M. y Durán-Puga, N. 2014. Impactos del cambio climático en la distribución geográfica de *Gossypium hirsutum* L. en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10: 1885-1895.
- Rosenstock, N. 2011. Efectos potenciales del cambio climático y la intensificación Agrícola-Forestal sobre la distribución de los anfibios *Melanophryniscus sanmartini* y *Leptodactylus chaquensis* en Uruguay. Universidad de la República de Uruguay.
- Schoener, T.W. 1970. Nonsynchronous spatial overlap of lizards in patchy habitats. *Ecology*. 51: 408-418.
- Seoane, J. y Carrascal, L. M. 2008. Interspecific differences in population trends of Spanish birds are related to habitat and climatic preferences. *Global Ecology and Biogeography*. 17:111-121. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2007.00351.x>.
- Soberón, J. y Nakamura, M. 2009. Niches and distributional areas: concepts, methods, and assumptions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (Supplement 2), 19644-19650.
- Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., ... y Williams, S. E. 2004. Extinction risk from climate change. *Nature*. 427 (6970): 145-148.
- Urbani, F., D'alessandro, P., y Biondi, M. 2017. Using Maximum Entropy Modeling (MaxEnt) to predict future trends in the distribution of high altitude endemic insects in response to climate change. *Bulletin of Insectology*. 70 (2): 189-200.
- Warren, D.L. Glor, R.E., y Turelli, M. 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: Quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*. 62: 2868-2883.
- Wiens, J.J. y Graham, C.H. 2005. Niche conservatism: Integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 36:519-539.

Indicadores técnico-económicos de la producción del cultivo de tomate bajo agricultura protegida en la Comarca Lagunera, México

Technical – economic indicators for production of tomato crop under protected agriculture in the Comarca Lagunera, Mexico

Orona-Castillo I¹, Del-Toro-Sánchez CL², Fortis-Hernández M^{1,3}, Preciado-Rangel P¹, Espinoza-Arellano JJ⁴, Rueda-Puente E^{2*}, Flores-Vázquez M¹, Cano-Ríos P⁵

¹ Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Agricultura y Zootecnia, Gómez Palacio, Durango, México.

² Departamento de Investigación y Posgrado en alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro Hermosillo, Sonora, México.

³ Tecnológico Nacional de México – Campus Instituto Tecnológico de Torreón. Carr. Antigua Torreón-San Pedro, km 7.5. Ejido Ana. Torreón, Coahuila,

⁴ Facultad de Contaduría y Administración, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón, Blvd. Revolución 153 oriente, Torreón, Coahuila, México.

⁵ Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez, Valle Verde, Torreón Coahuila.

RESUMEN

México se encuentra en el décimo lugar a nivel mundial en la producción de tomate. La Comarca Lagunera tiene un rol importante en las exportaciones principalmente a Estados Unidos de América. Debido a la importancia económica y social en la región, el objetivo del presente estudio consistió en determinar los indicadores de productividad del agua, suelo, mano de obra y capital, lo que apoyará al productor a tomar mejores decisiones. Para realizar el estudio se seleccionaron mediante muestreo sistemático cinco unidades de producción bajo malla sombra que ocuparon el 50 % de la superficie total sembrada y por medio de una encuesta se obtuvo la información necesaria. Se encontró que el valor promedio de rendimiento fue de 11.9 kg de tomate por metro cuadrado; 54.3 kg de tomate por metro cúbico de agua, y de 61.9 y 99.7 pesos los ingresos netos obtenidos por metro cuadrado de superficie y metro cúbico de agua, respectivamente. Los mayores valores fueron registrados por las unidades de producción de mayor tamaño, concluyendo que este comportamiento obedece a la mayor economía de escala y mayor cuidado con que se maneja el cultivo.

Palabras Clave: *Solanum lycopersicum*; rendimiento; economía; productividad; agua; suelo y recurso capital.

ABSTRACT

Mexico is in the tenth place in worldwide tomato production. The Comarca Lagunera has an important role in exports, mainly to the United States of America and allocated an area for cultivation of 984 ha under shade mesh with a production of 138,036 t. Due to the economic and social importance in the region, the objective of this study was to determine the productivity indicators of water, soil, labor,

and capital, which will support the producer to make better decisions. To carry out the study, five production units under shade mesh were selected through systematic sampling, which occupied 50 % of the total planted area, and the necessary information was obtained through a survey. It was found that the average yield value was 11.9 kg of tomato per square meter; 54.3 kg of tomato per cubic meter of water, and 61.9 and 99.7 pesos for the net income obtained per square meter of surface and cubic meter of water, respectively. The highest values were recorded by the largest production units, concluding that this behavior is due to the greater economy of scale and greater care with which the crop is managed.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; performance; economy; productivity; water; land and capital resource.

INTRODUCCIÓN

En México, la producción de tomate (*Solanum lycopersicum*) creció a una tasa promedio anual de 4.8 % entre 2006 y 2016, para ubicarse en un máximo histórico de 3.3 millones de t. Durante ese período, la superficie total destinada a este cultivo disminuyó a una tasa promedio anual de 2.5 %. Por el contrario, la superficie establecida con agricultura protegida (AP), malla sombra e invernadero, crecieron a una tasa promedio anual de 30.1 %. Así, el volumen de tomate obtenido con el uso de estas tecnologías pasó del 6.5 % en 2006 a 32.2 % en 2010, y 60.7 % del volumen total en 2016 (FIRA, 2017). El cultivo de tomate en AP representa 70 % de la superficie cultivada (INEGI, 2018).

México a nivel mundial se encuentra en la posición número 10 con una participación de 87,918 ha cosechadas de tomate y con una producción de 4,271,914 t (FAOSTAT, 2021). De acuerdo con el SIAP (2020) el tomate es la principal

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

Recibido: 27 de marzo de 2022
Aceptado: 11 de agosto de 2022

hortaliza que se exporta. Para el año 2020 en la Comarca Lagunera, ubicada en el norte-centro de México, se cosecharon 984 ha con una producción de 138,036 t de las cuales el sistema predominante fue agricultura protegida con malla sombra (SIAP, 2020).

Levitan y Werneke (1984), mencionan que la tecnología y la educación permiten generar diferencias en la productividad a través del tiempo y que la caracterización tecnológica de la producción de tomate permitirá comprender la dinámica y funcionamiento del cultivo en el contexto de su desarrollo, evolución y cambio con la finalidad de lograr planes y programas para grupos con características similares (Valerio *et al.*, 2004).

La AP es un sistema de producción desarrollado con fines de proporcionar a las plantas las condiciones ideales para su desarrollo, y con ello expresen el máximo potencial productivo (Vargas-Canales *et al.*, 2018). De igual forma, es posible manejar las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, nutrición, agua, luz, etcétera) y algunos otros riesgos (plagas y enfermedades) para el mejor desarrollo de los cultivos (Jasso *et al.*, 2012; Marjorie *et al.*, 2017). AP es el término utilizado para describir una serie de técnicas de cultivo que controlan total o parcialmente el microclima que rodea al cuerpo de la planta de acuerdo con las necesidades de la especie durante su período de crecimiento. La AP en México se ha desarrollado como una estrategia para reducir emisiones contaminantes que contribuyen al calentamiento global; estrategia que se ajusta a recomendaciones de la FAO sobre la intensificación sostenible de la producción agrícola (Pratt y Ortega, 2019), cuyo propósito de este sistema de producción se centra en incrementar y mantener la productividad en cantidad, calidad y oportunidad comercial (Castañeda *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2011). Una estrategia que se lleva a cabo en la AP es utilizando la malla sombra que sirve para proteger cultivos, hortalizas y áreas recreativas de las inclemencias solares; los materiales con que están desarrolladas las mallas, son de materiales que ayudarán al resguardo y cuidado de plantas; además, de poder ahorrar agua y energía. Esta tela repele los rayos del sol, evitan cambios inesperados de temperatura para las plantas y mantienen la humedad ideal entre el suelo y la tela, la cual propiciará el crecimiento saludable de tus cultivos. Están hechas de polietileno, polipropileno, poliéster y en algunos casos tienen algún tratamiento aluminizado debajo de la tela. Los porcentajes de sombra que usualmente son utilizados van desde un 35 % hasta un 95 %.

La productividad es considerada como la forma de utilizar los factores de producción en la generación de bienes y servicios para obtener beneficios y se resume como el cociente entre los productos generados y los insumos productivos empleados, y la productividad en malla sombra puede aumentar a través de la incorporación de mejores tecnologías (Díaz, *et al.*, 2018; Fontalvo-Herrera *et al.*, 2018).

Para México es muy importante evaluar estos indicadores ya que es el principal exportador de tomate a nivel mundial; en el 2016 contribuyó con el 25.11 % del valor de las

exportaciones mundiales, cubriendo el 90.67 % de las importaciones de Estados Unidos de Norte América y 65.31 % de Canadá (SAGARPA, 2017). Asimismo, por que existen factores hídricos y edáficos que juegan un papel preponderante en la productividad de los cultivos hortícolas, como lo es para el caso de tomate, bajo condiciones de AP (Fontalvo-Herrera *et al.*, 2018; Díaz *et al.*, 2018).

Por todo lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron: a) evaluar la productividad de los recursos agua, suelo y capital utilizado en la producción de tomate bajo malla sombra a diferentes tamaños de superficie en la Comarca Lagunera, estableciendo como hipótesis que a mayor superficie establecida con malla sombra se obtienen mayores niveles de productividad de los recursos agua, suelo y rentabilidad por la economía de escala a que se practica el cultivo y, b) determinar el destino y precio de la producción de tomate cultivado en la Comarca Lagunera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La zona de estudio fue la Comarca Lagunera, ubicada en el centro-norte de México, considerada como una zona agrícola e industrial localizada entre los meridianos 102° 50' y 103° 40' longitud Oeste, y los paralelos 25° 25' y 26° 30' latitud Norte; en los estados de Durango y Coahuila. El clima de esta zona, según la clasificación de Köppen modificada por Enriqueta García, corresponde a BWhw" (e'), que se caracteriza por ser muy seco o desértico, semi cálido con invierno fresco, con una temperatura media anual entre 18 y 22 °C, y del mes más frío menor a 18 °C, con una precipitación media de 250 mm y una evaporación potencial del orden de 2,500 mm anuales.

Selección de productores y auscultación

Para realizar el estudio se obtuvo el padrón de productores de tomate en las oficinas del Sistema Producto Tomate, integrado por nueve productores con malla sombra. Con base a este padrón se eligieron por muestreo sistemático cinco unidades de producción donde están representadas todas las unidades de producción con tamaños diferenciados de superficie donde $(i) = N/n = 9/5 = 1.8$, es decir se seleccionó un productor de cada dos productores, ubicados en cuatro municipios, dos del estado de Coahuila (Matamoros, localizado en el suroeste del estado, en las coordenadas 103°13'42" longitud oeste y 25° 31'41" latitud norte, a una altura de 1,100 metros sobre el nivel del mar) y Francisco I. Madero (localizado en el suroeste del estado, en las coordenadas 103°16'23" longitud oeste y 25°46'31" latitud norte, a una altura de 1,100 msnm) y dos del estado de Durango: Gómez Palacio (ubicado en la zona noreste del estado entre las coordenadas geográficas son 25° 32' - 25° 54' de latitud norte y 103° 19' - 103° 42' de longitud oeste) y Tlahualilo (se encuentra al nordeste del estado en las coordenadas 26° 06' 12" de latitud norte y 103° 26' 26" longitud oeste, a una altura de 1,095 msnm), cuya superficie representó el 50 % de las 984 ha sembradas con tomate este año (SADER, 2022).

Los datos se obtuvieron de un cuestionario integrado por preguntas contestadas por las personas responsables de cada unidad de producción bajo malla sombra y por los técnicos de éstas; la primera parte captó datos de identificación del informante; la segunda, aspectos técnicos del cultivo, densidad y fecha de siembra, variedades, rendimientos, superficie, insumos y cantidades utilizadas en la siembra y desarrollo del cultivo, incluidos productos para control fitosanitario y nutrición del cultivo; y la tercera, mano de obra utilizada; costos de producción; precios de venta, destino de la producción, asistencia técnica y nivel de certificación de su unidad agrícola.

Análisis de la auscultación

Revisada la información de los cuestionarios se procedió a su captura, utilizando para ello el Programa Microsoft Excel donde se calcularon frecuencias, promedios, volúmenes, costos totales, ingresos netos, porcentajes de producción destinados al consumo interno y externo, etc., determinándose para cada unidad agrícola y el promedio de los indicadores de eficiencia en el uso de los recursos suelo, agua, capital (rentabilidad), habiéndose hecho el análisis comparativo correspondiente entre estas. La productividad del suelo y el agua se calcularon tomando en cuenta los rendimientos obtenidos divididos entre la superficie ocupada por la malla sombra y el volumen de agua utilizado durante el ciclo del cultivo. La rentabilidad del uso de dichos recursos y el recurso mano de obra (jornal utilizado) se estimó dividiendo los beneficios netos totales alcanzados por la venta del tomate de la unidad de producción, entre la superficie, el volumen de agua y los jornales utilizados por unidad de superficie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aspectos técnicos

Tamaño de la unidad de producción

El valor mínimo y máximo registrado para el tamaño de superficie sembrada con malla sombra del cultivo de tomate en la Comarca Lagunera, osciló entre seis y 230 ha respectivamente, encontrándose un tamaño promedio de 98.9 ha. La situación encontrada en la zona difiere a la prevalente a nivel nacional, donde el 86 % las unidades de producción de tomate son inferiores a 0.5 hectáreas; el 11.5 %, de 0.51 a 5, y el 2.5% tienen más de 5 ha, lo que limita su acceso a la tecnología, la capacitación y la asistencia técnica, así como a una mayor penetración en los mercados más exigentes (Ponce, 2019). Con lo anterior, contar con unidades de producción de mayor tamaño como es el caso de la zona de estudio, permitiría introducir tecnologías eficientes en el uso de agua, mejor aprovechamiento de nutrientes aplicados por medio del sistema de riego, mayor protección contra plagas y eventos climáticos como granizos, y mejor calidad de producto. Sin embargo, el costo de producción bajo malla sombra resulta muy elevado, por lo que requiere mayor inversión, capacitación de la mano de obra y asistencia para el manejo del proceso productivo.

Rendimiento por hectárea

El rendimiento de tomate promedio alcanzado fue de 120.8 t ha⁻¹; el valor más alto lo registró la unidad agrícola de mayor tamaño con 170 t ha⁻¹ y el menor rendimiento la unidad de menor tamaño, con 90 t ha⁻¹. Estos valores están por encima del registrado a nivel nacional para el cultivo en general, que son de 48.6 t ha⁻¹, lo que demuestra las bondades del sistema de producción bajo malla sombra (Díaz *et al.*, 2018; Fontalvo-Herrera *et al.*, 2018) y de aquellos producidos en el estado de Jalisco acorde a Cih-Dzul *et al.* (2011).

Densidad de planta por unidad de superficie

Esta variable osciló entre 23 y 33 mil plantas de tomate por hectárea, es decir, 2.3 a 3.3 plantas por metro cuadrado, registrándose un valor promedio de 27,400 plantas; la unidad agrícola de menor tamaño (6 ha) fue la que utilizó la menor densidad de todas y la que empleó la mayor densidad de plantas fue la unidad agrícola de mayor tamaño. Al respecto, Alvarado (2014), indica que la densidad de plantación bajo malla sombra va de 20 a 30 mil plantas por hectárea y Jasso *et al.* (2012) señalan que puede variar en función del híbrido o variedad, pero puede alcanzar hasta 31, 250 plantas.

Producción de tomate por metro cuadrado de superficie

Los kg obtenidos por m² oscilaron entre los 7.5 y 17 kg; el valor más bajo correspondió a la unidad agrícola de menor tamaño y más alto a la de mayor tamaño. El valor promedio encontrado para este elemento fue de 11.9 kg/m². Es pertinente aclarar que dicho valor cambia según la variedad establecida. El valor reportado por Alvarado *et al.* (2014) para el noreste de México osciló entre 9.8 y 19.6 kg.

Variedades de tomate utilizadas

La variedad Sahariana (King Seeds, Guadalajara, México) fue utilizada por el productor de mayor superficie; el productor de menor superficie sembró las variedades Sahel (Syngenta, Ciudad de México, México), Moctezuma (Ahern Seeds, Culiacán, Sinaloa, México), Cuauhtémoc (Ahern Seeds, Culiacán Sinaloa, México) y Top 1182 (Ahern Seeds, Culiacán Sinaloa, México). La variedad con mayor frecuencia utilizada por los productores fue la Top 1,182, seguida por las variedades Sahel, Moctezuma y Cuauhtémoc; en menor frecuencia figuraron las variedades Sahariana, Misión, Teniente, Ramsés y Aníbal (Figura 1).

En general todas estas variedades son de crecimiento indeterminado y se eligen por las características fenológicas de sus frutos y amplia tolerancia a distintos tipos de enfermedades, entre otros atributos. Específicamente la Top 1,182, que es la más frecuente, se caracteriza por ser una planta de vigor fuerte, madurez relativa intermedia, frutos grandes de peso promedio 140 a 160 g, buena forma y larga vida de anaquel.

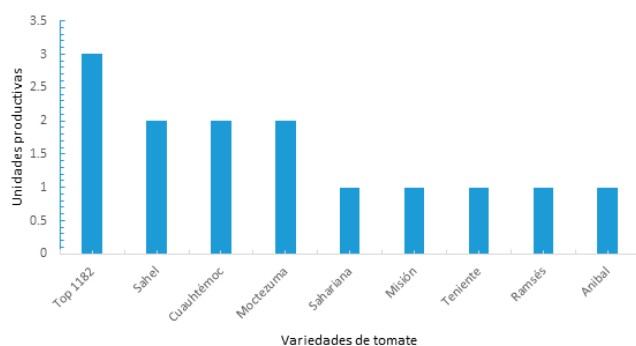


Figura 1. Frecuencia del uso de variedades de tomate sembradas bajo malla sombra por productores de la Comarca Lagunera.
Figure 1. Frequency of use of tomato varieties planted under shade mesh by producers in the Comarca Lagunera.

Fuente de agua y volumen de agua empleado

Al calcularse los volúmenes de agua utilizados durante el ciclo del cultivo, los datos arrojan que, el total de los productores de tomate bajo malla sombra, utilizan el agua subterránea para irrigar sus cultivos empleando para ello el sistema de riego por cintilla; se determinó que el volumen de agua de riego aplicado oscila entre 4,320 y 8,100 m³ y tiene dependencia del tipo de suelo (arenoso o arcilloso). En promedio, se consideró un volumen aplicado de 6,210 m³ por hectárea desde el establecimiento del cultivo hasta su cosecha. El ciclo productivo comprendió 120 días (Figura 2).

Productividad del agua de riego

Considerando los diferentes rendimientos obtenidos por las unidades agrícolas bajo estudio, se encontró que por cada metro cúbico de agua aplicado, es posible obtener una producción promedio de 19.45 kg de fruta; sin embargo, se observa que la unidad agrícola de mayor superficie logra un valor de 23.37 y la de menor tamaño 14.49 kg (Figura 2).

El volumen de agua requerido para producir un kilogramo de tomate en la Comarca Lagunera se estimó en 54.3 L, mientras el reportado por Henao (2016) a nivel nacional es de 99 y para Estados Unidos 40, quien concluye que este valor varía de acuerdo al nivel tecnológico utilizado. Fontalvo-Herrera *et al.* (2018) y Díaz *et al.* (2018), mencionan que para producir un kilo de tomate sembrando el cultivo a campo abierto se requieren 215 L y que bajo invernadero sólo se requieren 36 L (Figura 3).

Principales plagas del cultivo de tomate.

Las unidades agrícolas de mayor tamaño fueron las que registraron menor cantidad de plagas: Mosca blanca (*Bemisia tabaci*) minador de la hoja (*Liriomyza bryoniae*) y las de menor tamaño las que registraron mayor número. La Figura 4, muestra las plagas reportadas en las distintas unidades de producción. Al igual que en el estudio realizado para el estado de Jalisco (Cih-Dzul *et al.*, 2011), se encontró que mosquita blanca es la principal plaga en la zona de estudio.

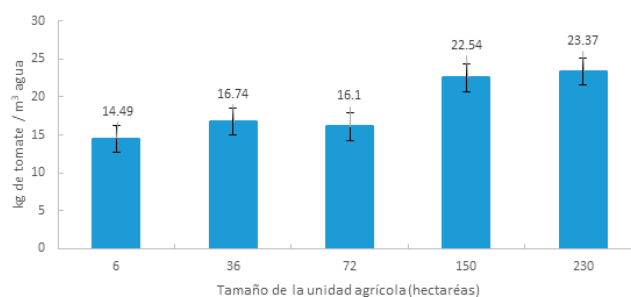


Figura 2. Productividad del metro cúbico de agua en kilogramos de tomate bajo malla sombra en unidades agrícolas con distintas superficies en la Comarca Lagunera.
Figure 2. Productivity of the cubic meter of water in kilograms of tomatoes under shade mesh in agricultural units with different surfaces in the Comarca Lagunera.

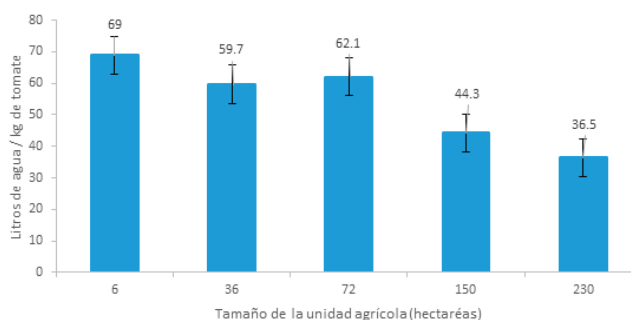


Figura 3. Litros de agua necesarios para producir un kilogramo de tomate bajo malla sombra en unidades agrícolas con distintas superficies en la Comarca Lagunera.
Figure 3. Liters of water needed to produce a kilogram of tomato under shade mesh in agricultural units with different surfaces in the Comarca Lagunera.

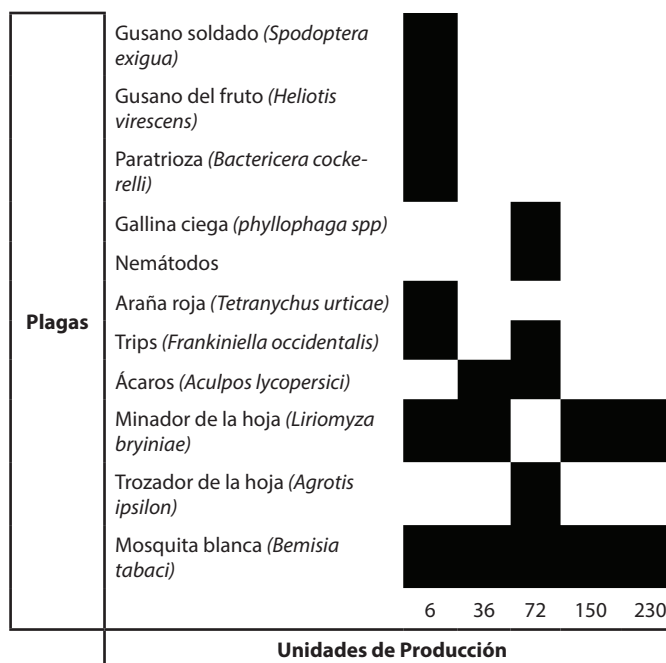


Figura 4. Unidades de producción afectadas por plagas reportadas en la Comarca Lagunera.
Figure 4. Production units affected by pests reported in the Comarca Lagunera.

Enfermedades principales en el cultivo

Durante el desarrollo del cultivo, se presentaron diferentes enfermedades generadas por distintos fitopatógenos; cada unidad agrícola tiene su propio laboratorio de diagnóstico fitosanitario, donde las muestras fueron analizadas y al identificar el agente causal, fueron controladas con la aplicación de distintos productos químicos (Figura 5).

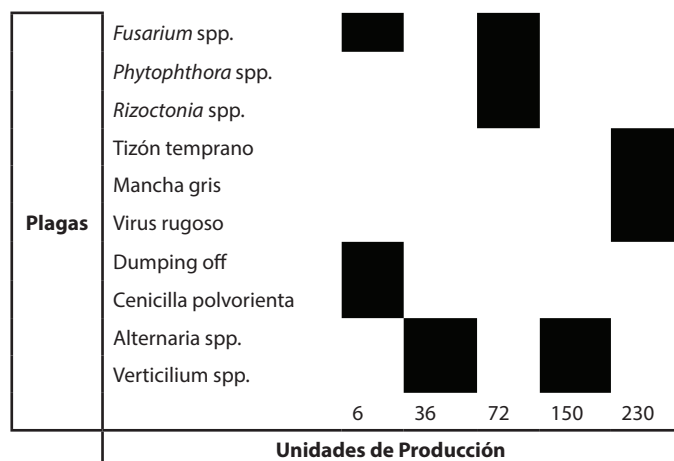


Figura 5. Enfermedades reportadas en el cultivo de tomate por distintas unidades de producción en la Comarca Lagunera. 0 a 230 = Unidades de Producción agrícola

Figure 5. Diseases reported in tomato cultivation by different production units in the Comarca Lagunera. 0 to 230 = Agricultural Production Units

Aspectos económicos

Destino y precio de la producción

De las cinco unidades agrícolas estudiadas tres exportan en promedio el 74 al 85 % de su producción hacia el mercado de Estados Unidos, figurando aquellas que presentan una superficie de 72 a 230 ha. Al respecto, Estrategia Aduanera (2021), reportó que para el año 2020, aproximadamente 80 % de los tomates que utilizan sistemas agrícolas protegidos se exportan y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) proyecta un crecimiento de las exportaciones del 2% para el ciclo 2021-2022. Por su parte aquellas unidades agrícolas de menor tamaño a 72 ha, destinan toda su producción al mercado nacional (Figura 6).

Del total de producción destinada al mercado nacional dos terceras partes se venden como producto de primera calidad; una cuarta parte como tomate de segunda y el resto como tercera. Los precios rurales promedio fueron de 7.60, 6.40 y 5.33 pesos mexicanos por kg para los tomates de primera, segunda y tercera calidad, respectivamente tomando en cuenta la calidad organoléptica solicitada para ser exportado. De acuerdo a la información proporcionada por los productores, el precio de exportación de los tomates de primera y segunda calidad registrados para el año de estudio, fue de 10 y 8 pesos, respectivamente. El total de ingresos provenientes del mercado externo resultó ser seis veces mayor que el del mercado interno.

FIRA (2017), señala que los precios del tomate rojo en el mercado nacional difieren de acuerdo con el tipo de producto (cultivado a campo abierto o en invernadero, orgánico, etc.) y de la variedad (saladette, bola y cherry).

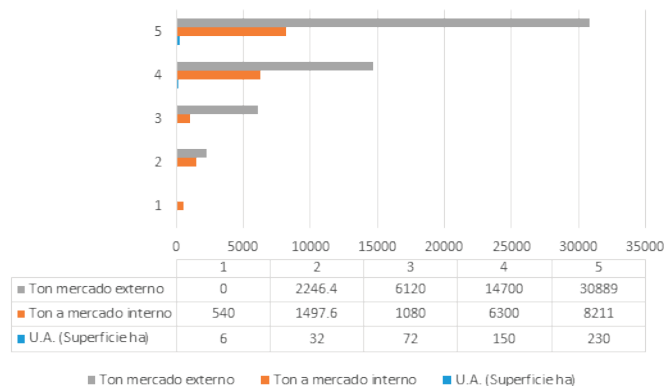


Figura 6. Volumen de producción de tomate obtenido bajo malla sombra destinado al mercado interno y externo por las distintas unidades de producción agrícolas. (Ton mercado externo = t exportadas al exterior; Ton mercado interno = t de producción dirigidas al consumo nacional; U.A. = Superficie en ha de las Unidades Agrícolas).

Figure 6. Volume of tomato production obtained under shade mesh destined for the internal and external market by the different agricultural production units (Ton foreign market = t exported abroad; Ton domestic market = t of production for national consumption; U.A. = Area in ha of Agricultural Units).

Costos de producción

De acuerdo con la información proporcionada, se advierte que el costo de producción promedio para producir un kg de tomate asciende a 4.02 pesos; sin embargo, la línea de tendencia indica que, a mayor superficie establecida, este valor disminuye (Figura 7).

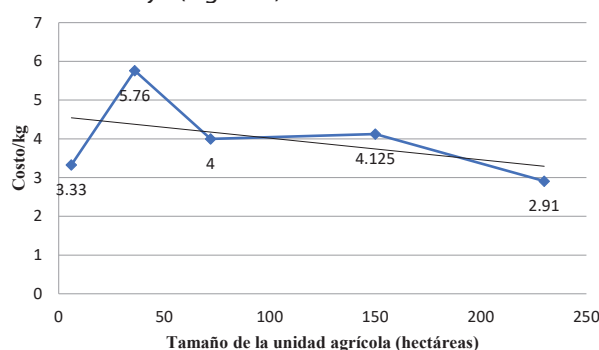


Figura 7. Costo de producción por kilogramo de tomate reportado por las distintas unidades de producción.

Figure 7. Production cost per kilogram of tomato reported by the different production units.

Indicadores económicos

En la Tabla 1, se observa que los ingresos netos obtenidos por metro cuadrado de suelo son mayores en las U.A. de mayor superficie, al igual que los ingresos netos derivados del m³ de agua utilizada. Sin embargo, el valor promedio de ambos indicadores es de 61.9 y 99.7, respectivamente. Por otra parte, el ingreso neto promedio por jornal empleado fue de 896 pesos. A este respecto Ríos et al. (2010) señalan que los avances tecnológicos han permitido incrementar la productividad de la mano de obra, medida como el rendimiento por hectárea entre el número de jornales utilizados; en este caso sería el total de ingresos netos obtenidos por hectárea entre el número de jornales utilizados.

Zoilo *et al.* (2018), citan que otros aspectos por considerar en los indicadores económicos figuran los costos de producción y el precio de venta; el primero detallando las diferentes labores culturales con sus pertinentes insumos y jornales necesarios para el desarrollo del cultivo, con sus respectivas cantidades y precios; y el segundo (precio de venta), que con base a la oferta y demanda, en la mayoría de las comercializaciones juega un papel importante en el valor económico de la producción. Molina (2017), por su parte manifiesta que existen otros supuestos interesantes por tomar en cuenta como son el perfil del productor y el grado de responsabilidad social y sustentable que tenga la unidad de producción agrícola, pues existen sistemas de producción donde por ejemplo, el control de plagas es un factor primordial para decidir qué tipo de control será el ejercido, ya que entre más agroecológico sea el sistema de producción, los costos de producción elevados en comparación del convencional y en ocasiones cuando las condiciones favorecen a las plagas, se dificulta la producción en el cultivo.

Tabla 1. Indicadores económico – sociales del cultivo de tomate bajo malla sombra en la Comarca Lagunera.

Table 1. Economic and social indicators of tomato cultivation under shade mesh in the Comarca Lagunera.

Tamaño (ha)	\$/m ² de suelo	\$/m ³ de agua	\$/jornal empleado
6	61.40	98.87	1 116.30
36	11.40	18.49	259.10
72	56.90	91.62	517.30
150	75.10	120.93	682.70
230	104.83	168.82	1 906.10

CONCLUSIONES

La productividad alcanzada por el cultivo del tomate bajo malla sombra que se practica en la Comarca Lagunera, es mayor en las unidades de producción con mayor superficie establecida, alcanzándose niveles de productividad en el manejo de agua, suelo y capital obtenido, lo cual sugiere que, a mayor inversión del productor, hay mayor nivel de exigencia en cuanto al manejo de la tecnología bajo malla sombra. El destino de la producción del tomate producido en la Comarca Lagunera es mayoritariamente para la exportación (80 %) principalmente hacia el mercado estadounidense, logrando con ello mayor precio por kilogramo vendido. La razón principal de esta situación obedece a que el total de las unidades agrícolas tomateras están certificadas ya que llevan a cabo las buenas prácticas agrícolas (BPA), establecidas por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad (SENASICA).

BIBLIOGRAFÍA

Alvarado, C.M., Díaz, F.A. y Hernández, M.R. 2014. Tecnología para producir tomates en casa malla para el norte de Tamaulipas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto para productores No. MX-0-310301-49-0313-10-60. ISBN; 978-607-37-330-7. Río Bravo Tamaulipas.

- Castañeda-Miranda, R., Ventura-Ramos, E., Peniche-Vera, R. y Herrera-Ruiz, G. 2007. Análisis y simulación del modelo físico de un invernadero bajo condiciones climáticas de la región central de México. *Agrociencia*. 41(3):317-335.
- Cih-Dzul, I. R., Jaramillo, V., Tornero, J. L. y Schwentesius, R.R. 2011. Caracterización de los sistemas de producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el estado de Jalisco, México. *Rev. Trop. Subtrop. Agroecos.* 14:501-512.
- Díaz, R.C., Pérez de la Cruz, J.M. y Ramos-Herrera, B. 2018. Nuevas y competitividad: implicaciones en una unión monetaria. *Rev. Econ. Mundial*. 49:39-56.
- Estrategia Aduanera. Revista Mexicana de Comercio Exterior. 2021. Disponible en: <https://www.estrategiaaduanera.mx/marcan-records-exportaciones-de-tomate-de-mexico-a-estados-unidos/> fecha=20/04/2022.
- FAOSTAT. 2021. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data> fecha=02/04/2022.
- FIRA. 2017. Panorama agroalimentario (Tomate Rojo 2017). Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. 25 p. Disponible en: <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-agraria-antonionarro/microbiologia/panorama-agroalimentario-tomate-rojo-2017/9731893> fecha=04/01/2022
- Fontalvo-Herrera, T., De La Hoz-Granadillo, E. y Morelos-Gómez, J. 2018. La productividad y sus factores: incidencia en el mejoramiento organizacional. *Dimens. Empres.* 16(1):47-60.
- Henao, O. F. Tomate y la huella de agua. 2021. Disponible en: <https://www.iagua.es/blogs/ferley-henao/tomate-y-huella-agua> fecha=04/01/2022.
- INEGI. 2018. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Encuesta Nacional Agropecuaria 2017.
- Jasso, Ch. C., Martínez, G. M.A., Chávez, V.J.R., Ramírez, T. J.A. y Garza, U. E. 2012. Guía para cultivar jitomate en condiciones de malla sombra en San Luis Potosí. Folleto Técnico No. MX-0-310305-49-03-17-09-44 ISBN: 978-607-425-821-9. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental San Luis Potosí, S.L.P.
- Levitan, S.A. y Werneke, D. 1984. Productivity: problems, prospects, and policies. The Johns Hopkins University Press No. 40.
- Marjorie, A.C., Salinas, P.L., Rodríguez A.F., Olivares, P.N., Riquelme, S.J., Antúnez, B.A., Martínez, C., Corradini, S.F., Sepúlveda, S.P., Abarca, R.P., Guzmán, L.A. y Felmer, E.S. 2017. Manual de cultivo del tomate bajo invernadero, Boletín INIA No. 12. Editora: Torres, P.A. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Manual del cultivo del tomate bajo invernadero. Boletín INIA, No. 12, ISSN: 0717-4829.
- Molina, N. 2017. Marketing hortícola del Nordeste Argentino en el mercado central de Buenos Aires, durante el trienio 2014-2016. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/marketing-horticola-del-nea-en-el-mercado-central-de-buenos-aires-durante-el-trienio-2014-2016> fecha=04/01/2022.
- Moreno, R. A., Aguilar, D. J. y Luévano, G. A. 2011. Características de la agricultura protegida y su entorno en México. *Rev. Mex. Agroneg.* 15(29), 763-774.
- Ortiz-Jiménez, B., Jiménez-Sánchez, L., Morales-Guerra, M., Quispe-Limaylla, A., Turrent Fernández, A., Rendón-Sánchez, G. y Rendón-Medel, R. 2013. Nivel de adopción de tecnologías para la producción de jitomate en productores de pequeña escala en el estado de Oaxaca. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 4(3):447-460.

- Ponce, C.P. 2019. Producción de tomates en invernadero en México. Disponible en: <https://www.hortalizas.com/horticultura-prottegida/produccion-de-tomates-en-invernadero-en-mexico/> fecha=04/01/2022.
- Pratt, P. y Ortega, J.M. 2019. Elaboración de la metodología para el primer bono verde certificado. En: Agricultura Protegida en México, Nieto, E. y Braly C. I. Editores. Banco Interamericano de Desarrollo Nota Técnica No. IDB-TM-1668. 73 p.
- Ríos-Flores, J. L., Torres-Moreno, M., Cantú-Brito, J. E., Caamal-Cauich, I., Jerónimo-Ascencio, F. y Cruz-Martínez, A. (2010). Producción, productividad y rentabilidad de maíz grano (*Zea mays*) bajo riego por bombeo en la Laguna, México de 1990 a 2006. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 9, 21-26. Retrieved from [https://chapingo.mx/revistas/phpscript/download.php?file=completo&id=MTc3OQ==\[Links\]](https://chapingo.mx/revistas/phpscript/download.php?file=completo&id=MTc3OQ==[Links]) fecha=06/06/2021.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Disponible en: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/mex189989.pdf> fecha=02/11/2021.
- SIAP. 2020. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Agricultura protegida. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430> fecha=30/06/2021.
- Vargas, C. J. M., Palacios-Rangel, M. I., Aguilar-Ávila, J., Ocampo-Ledesma, J. y Medina-Cuellar, S. E. 2018. Efficiency of small enterprises of protected agriculture in the adoption of innovations in Mexico. *Estudios Gerenciales*, 34 (146), 52-62.
- Valbuena-Díaz, N., Leal-Guerra, M. y Urdaneta-Montiel, A. 2018. ADN organizacional y productividad en las empresas familiares. *Desarrollo Gerencial*. 10(1):105-122.
- Díaz, V. N.J. y Leal, G.M. 2018 ADN organizacional y productividad en las empresas familiares. *Desarrollo Gerencial*. 10(1):105-122.
- Valerio, C. D., García, M. A., Acero, de la C. R., Castaldo, A., Perea, J. M. y Martos, P. J. 2004. Metodología para la caracterización y tipificación de sistemas ganaderos. Departamento de producción animal Universidad de Córdoba. Producción animal y gestión. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/326791472_ADN_organizaciona_y_productividad_en_las_empresas_familiares fecha=09/07/2021.
- Zoilo, O. J., Bernardi, M. J., Colonese, M. C. y Castro, J. E. 2018. Tecnologías de producción y costos disponibles para la agricultura familiar: margen bruto e índices de rentabilidad. 1ra. Edición. -- Publicación EEA Bella Vista. Serie Técnica Nº 66. 2018. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_s.t._66_tecnologias_de_produccion_y_costos_disponibles_para_la_agricultura_familiar.pdf fecha=07/10/2021.

Composición fenólica, actividad antihemolítica, antiinflamatoria y antibacteriana de propóleos del sur de Sonora

Phenolic compounds, antihemolytic, anti-inflammatory and antibacterial activity of propolis from southern Sonora

Portela-Márquez MA¹, Ruiz Cruz S², Morán-Palacio EF³, Chaidez-Quiroz C⁴, Silva-Beltrán NP^{5*}

¹ Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro, 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México.

² Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

³ Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuaria, Universidad de Sonora, Lázaro Cárdenas del Río 100, Francisco Villa, 85880, Navojoa, Sonora, México.

⁴ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera El Dorado Km 5.5, Campo el Diez, 80110, Culiacán, Sinaloa, México.

⁵ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Blvd. Bordo Nuevo S/N, Ejido Providencia, 85199, Cajeme, Sonora, México.

ABSTRACT

Propolis is a resin made by *Apis mellifera* bees from vegetation exudates. Biological properties have been documented. This study evaluated the antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activity of ethanolic extracts from southern Sonora, Mexico propolis. The concentration of total phenols and flavonoids was measured. Antioxidant activity was measured and antihemolytic and anti-inflammatory activity of human erythrocytes was determined. In addition, the activity against *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* bacteria was evaluated. The ethanolic extracts presented concentrations of 16.36 ± 1.93 mg EAG/gPS and 42.96 mg EQ/gPS of phenols and flavonoids, respectively. The DPPH and ABTS radicals showed values of 75.65 ± 3.76 and 29.61 ± 0.01 mg ET/gPS respectively, the extracts protected up to 49.56% from hemolysis and prevent cell inflammation up to 49%. They also presented antibacterial activity against all the strains evaluated, showing inhibition halos of 8 to 11.3 mm and MIC of 1 and 2 mg of extract/mL. The results are the basis for the study of natural formulations with propolis from southern Sonora.

Key words: Propolis, antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory.

RESUMEN

El propóleo es una resina que elaboran las abejas *Apis mellifera* a partir de los exudados de la vegetación. Las propiedades biológicas han sido documentadas. Este estudio evaluó la composición química, actividad antioxidante (con radicales DPPH y ABTS), actividad antihemolítica, antiinflamatoria (sobre eritrocitos humanos) y antibacteriana en *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* en extractos etanólicos de propóleos de sur de Sonora, México. La composición química fue de 16.36 ± 1.93 mg EAG/PS y 42.96 mg EQ/PS de fenoles y flavonoides, respectivamente. Los radicales DPPH y ABTS mostraron valores de 75.65 ± 3.76 y 29.61 ± 0.01 mg ET/

gPS respectivamente. Los extractos protegieron hasta en un 49.56 % de la hemólisis por el radical y previnieron la inflamación por arriba del 49 %. Todos los extractos de propóleos mostraron actividad antibacteriana con halos de inhibición de 8 a 11.3 mm y CMI de 1 y 2 mg de extracto/mL. Los resultados obtenidos son la base para el estudio de formulaciones naturales con propóleos del sur de Sonora.

Palabras clave: Propóleo, antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio

INTRODUCCIÓN

El propóleo es una resina elaborada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de exudados de la vegetación circundante de la colmena, el cual es utilizado con fines desinfectantes y de eliminación de invasores que pueden estar dentro de la misma (Bankova, 2005). Gracias a la protección que genera el propóleo en las colmenas, se mantienen condiciones óptimas de humedad, temperatura y otros factores que garantizan la asepsia, de esta manera se evita la proliferación de microorganismos como bacterias, hongos o virus (Palomino *et al.*, 2010). En los últimos años se han documentado las propiedades beneficiosas del propóleo destacándose la gran actividad antimicrobiana, antiviral, anestésica, antiinflamatoria, anticancerígena y antioxidante (Rivero y Martínez, 2015). En ese sentido los extractos elaborados a base de propóleo se han venido utilizado en el área alimenticia o farmacológica.

Los extractos de propóleo (acuosos, etanólicos o supercríticos) contienen sustancias activas como flavonoides y polifenoles, a dichos compuestos se les ha atribuido actividad farmacológica (Silva *et al.*, 2012). Además, se han demostrado en numerosas investigaciones la complejidad de su composición química, reportándose más de 300 compuestos tales como terpenoides, esteroides, aminoácidos o polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres) (Mello y Hubinger, 2012). Los flavonoides son ácidos aromáticos diterpenoides y junto con los compuestos fenólicos forman los principales constituyentes químicos responsables de las propiedades biológicas del propóleo (Siripatrawan

*Autor para correspondencia: Norma Patricia Silva Beltrán
 Correo electrónico: norma.silva@unison.mx

Recibido: 27 de abril de 2022

Aceptado: 19 de julio de 2022

et al., 2013). Estudios previos en propóleos mexicanos han reportado la presencia de compuestos activos tales como flavonoides, principalmente pinocembrina, pinobanksina y crisina (Hernández *et al.*, 2007), también se han detectado propiedades antibacterianas contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, y *Staphylococcus aureus*, atribuyéndose esta propiedad biológica a las flavonas presentes en el extracto (Londono *et al.*, 2010; Carrillo *et al.*, 2011). En el estado de Sonora, se han realizado estudios similares, los resultados muestran la identificación y cuantificación de compuestos activos, además de las diversas actividades biológicas de los propóleos, como la actividad antiproliferativa en extractos metanólicos (Li *et al.*, 2010). También se ha observado que las estaciones del año influyen en la actividad biológica de los mismos (Valencia *et al.*, 2012) y que la composición depende de la región donde se recolecta puesto que sus características están relacionadas por factores botánicos, geográficos y por el clima (Mello y Hubinger, 2012). Debido a esto existe una relación estrecha de la composición química del propóleo con la flora disponible para que las abejas produzcan el propóleo (Aguilar *et al.*, 2019).

Los conocimientos que se tienen actualmente sobre la composición del propóleo y sus propiedades biológicas en México son limitados. En la literatura consultada, no se encuentra reporte alguno sobre otras actividades biológicas de propóleos con actividad y antiinflamatoria utilizando células sanguíneas o algún estudio antioxidante donde se evalúe la capacidad protectora del eritrocito humano de propóleos en el sur de Sonora. En ese contexto el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana presente en los extractos etanólicos de propóleos obtenidos del sur de Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de recolección de los propóleos

Las muestras de propóleo de abejas (*Apis mellifera*) fueron obtenidas en bruto de apiarios y se muestreó de acuerdo con SAGARPA, (2017). La ubicación de los apiarios se muestra en la Tabla 1 y el periodo de recolección fue de octubre de 2019 a enero de 2020. Las muestras se almacenaron en bolsas herméticas y se trasladaron al Laboratorio de Tecnologías Emergentes e Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación e Innovación Biotecnológica, Agropecuaria y Ambiental (CIIBAA) en el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) unidad centro de Cd. Obregón Sonora, en donde se fraccionaron en trozos de 2 cm aproximadamente y se colocaron en refrigeración a -20 °C para su posterior análisis. Las claves con las que se identificaron las muestras obtenidas de los diversos apiarios del sur de Sonora México, así como su origen se muestra en la Tabla 1, así mismo, en la Figura 1 se observa en dónde se localizan dichas poblaciones.

Preparación del extracto etanólico de propóleo

La preparación del extracto etanólico se realizó según la NOM-003 (2017). Se pesaron 50 g de los propóleos en bruto previamente triturado con una licuadora convencional hasta

Tabla 1. Ubicación de los apiarios donde fue obtenido el propóleo sonorense.

Table 1. Location of the apiaries where Sonoran propolis was obtained.

POBLACIÓN	COORDENADAS	CLAVE
Ejido Francisco Javier Mina (Campo 60)	(27°27'43"N) (110°6'53"W)	EP60
Bácum	(27°30'40"N) (110°6'32"W)	EPB
Tinajera	(27°33'16"N) (110°00'47"W)	EPLT
Jusibampo	(27°19'N) (111°16'W)	EPJ
Etchojoa	(27°0'12"N) (109°35'0.2"W)	EPE
Ejido Francisco Villa	(27°29'0.9"N) (110°03'24"W)	EPFV

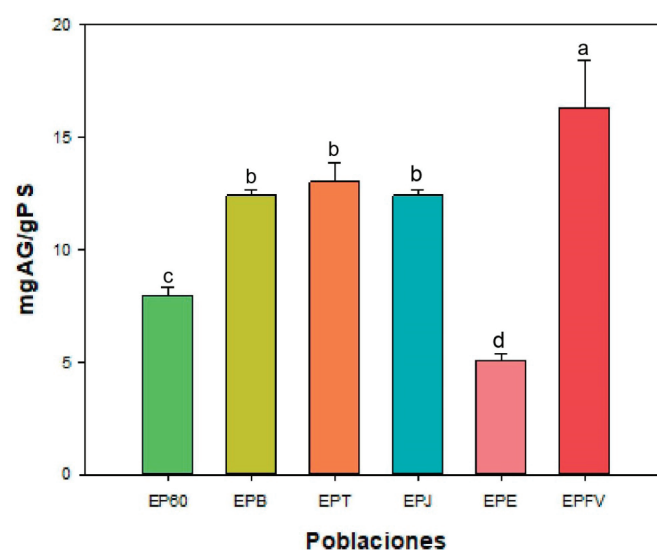


Figura 1. Contenido de fenoles totales en extractos etanólicos de propóleos de diversas poblaciones del sur de Sonora. Media ± desviación estándar (n=3).

Figure 1. Total phenol content in ethanolic extracts of propolis from different populations in southern Sonora. Mean ± standard deviation (n=3).

obtener un polvo. Posteriormente, se añadió el pulverizado obtenido a etanol al 70% en una relación muestra: disolvente 1:3 y se colocó en baño ultrasónico durante 20 min a temperatura ambiente. Seguido de esto se filtró al vacío con papel Whatman No. 1. Por último, se concentró el extracto mediante evaporación rotativa a 45 °C (Buchi Heating Bath B-490, Buchi Rotavapor R-200) (Sultana *et al.*, 2009). El extracto fue almacenado a -20 °C en ausencia de luz para su posterior análisis.

Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se cuantificó mediante el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se colocaron 150 µL del reactivo Folin-Ciocalteu en una microplaca de 96 pocillos con 30 µL de extracto y 120 µL de Na₂CO₃. Se dejó reposar 30 min en completa oscuridad y se leyó a una absorbancia de 750 nm en lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan™ Sky). La concentración de fenoles totales se calculó utilizando una curva estándar de ácido gálico y los resultados se expresaron

como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/PS).

Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó de acuerdo con el método descrito por Chen *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Primero se tomó 100 μL del extracto y se mezcló con 430 μL de NaNO_2 al 5 %, seguido de una incubación por 5 min. Pasado el tiempo se adicionaron 30 μL de AlCl_3 al 10 % y 440 μL de NaOH (1 M). Se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific MultiskanTM Sky). Se realizó una curva estándar de quercetina y los resultados se expresaron como mg EQ/PS.

Determinación de la actividad antioxidante de los propóleos

Inhibición del radical DPPH (2,2 - difenil-1-picrilhidracil)

Se midió la capacidad antioxidante de los extractos para inhibir el radical DPPH según Moein y Moein (2010), con algunas modificaciones. Se tomaron 280 μL de la solución del radical DPPH (0.025 mg/mL en etanol) y se mezcló con 20 μL del extracto. La reacción se dejó reposar por 30 min en completa oscuridad y se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific MultiskanTM Sky). La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como μmol Equivalente Trolox/g de peso seco (μmol ET/PS).

Inhibición del radical ABTS (2,2' - azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

Se determinó de acuerdo con la técnica descrita por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. El radical ABTS se preparó al mezclar 19 mg en 5 mL de agua destilada. Por otro lado, se preparó una solución de persulfato de potasio (37.8 mg/mL en agua destilada). Se tomaron 88 μL del radical ABTS preparado y se le añadió a la solución de persulfato de potasio, dicha mezcla se dejó reposar por 12 - 16 h a temperatura ambiente. De esta solución incubada se tomó 500 μL y se diluyó en 30 mL de etanol para posteriormente ajustar la absorbancia a 0.7 ± 0.02 en lector de microplacas a 750 nm. Finalmente se colocaron 295 μL de radical y 5 μL del extracto. La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como μmol eq. Trolox/g de peso seco (μmol ET/PS).

Capacidad protectora del eritrocito humano

La hemólisis fue inducida por el radical AAPH (2-2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) de acuerdo con la metodología de Son (2016). Los eritrocitos fueron lavados en 3 tiempos con buffer salino (PBS) a pH de 7.4. Una vez lavados se preparó una suspensión de eritrocitos humanos al 5 % en PBS. Para el ensayo se colocaron en un tubo Eppendorf 50 μL de la suspensión de eritrocitos, 50 μL del extracto a evaluar y 200 μL del radical AAPH, se mezcló e incubó a 37 °C en baño María con agitación (30 rpm) durante 3 h. Una mezcla de reacción similar se preparó sin extracto

como control (hemólisis completa). Terminada la incubación se agregó 1 mL de PBS, se centrifugó a 3500 rpm por 10 min y se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Thermo Scientific MultiskanTM Sky) a 540 nm. El resultado se expresó en porcentaje de inhibición, mediante la fórmula:

Actividad antiinflamatoria

Estabilidad de la membrana del eritrocito por calor

El ensayo de la estabilidad de la membrana del eritrocito frente al calor se realizó según Sakat *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Se realizaron dos lavados de eritrocitos colocando 1 mL de sangre y 3 mL de solución salina, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante. Enseguida con los eritrocitos lavados se preparó una solución de eritrocitos, se tomaron 500 μL de la solución en 5 mL de solución salina para obtener una solución de eritrocitos al 5 %. Para el ensayo, en microtubos se colocaron 100 μL de eritrocitos y 100 μL de extracto, se calentó en baño María a 56 °C por 30 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 1 mL de solución salina, se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min y se leyó a una absorbancia de 560 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific MultiskanTM Sky).

Estabilidad de la membrana del eritrocito mediante la prueba de hipotonicidad

Para la estabilidad de la membrana del eritrocito mediante un medio hipotónico se realizará según Niraimathi *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Se preparó de igual manera que el ensayo de calor una solución de eritrocitos al 5%. El ensayo se realizó de la siguiente manera: Se colocó 200 μL de extracto en 100 μL de la suspensión de eritrocitos y se adicionó 500 μL de solución hipotónica (agua destilada). Se incubó a 37 °C durante 30 min y se colocó 200 μL de solución salina. Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm por 10 min y se tomó el sobrenadante para leer a una absorbancia de 560 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific MultiskanTM Sky).

Evaluación de la capacidad antibacteriana

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos se obtuvieron del Laboratorio de Tecnologías Emergentes e Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental (CIIBAA) de ITSON. *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 43890), *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus* (ATCC 65384), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

Ensayos microbiológicos

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la observación de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano descrito por Andrews (2001). En placas de agar Müller Hinton se inocularon con 100 μL de suspensión bacteriana la cual se homogenizó mediante perlas de vidrio estériles, se colocó 40 μL de extracto correspondiente en discos estériles de papel filtro (5 mm de diámetro, Whatman N° 1). Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h para su observación.

Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos que presenten actividad antibacteriana se determinó mediante la técnica de dilución en caldo MuelleHinton. A cada tubo se le agregó 2 mg del extracto a evaluar en 1 mL de caldo Mueller-Hinton. Por último, se agregó 100 μ L de inóculo en una concentración 10^8 UFC/mL, se incubó a 37 °C por 24 h. Se determinó la turbidez de cada tubo, siendo el de menor concentración y sin turbidez el que contiene la CMI (Gil *et al.*, 2008).

Análisis Estadístico

La evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos se realizó a través de experimentos independientes para cada tipo de extracto y de las especies microbianas estudiadas. El diseño estadístico fue asignado completamente al azar con tres repeticiones. En el análisis de los distintos tratamientos se asumió ($P < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico Stat Graphics versión 15.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Fenoles totales

Evaluar el contenido de fenoles y flavonoides totales en los propóleos es uno de los parámetros más importantes ya que de esta manera ayuda a establecer la calidad del material, así como su potencial biológico principalmente para la actividad antioxidante que puede representar (Rodríguez *et al.*, 2012). En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos de las diferentes muestras analizadas, donde se obtuvieron valores que van de 5.06 ± 0.289 a 16.30 ± 1.93 mgEAG/g PS. Se puede observar que en el extracto de propóleo del Ejido Francisco Villa presentó el valor más alto ($p < 0.05$), seguido del extracto de EPT, EPB y EPJ, los cuales no presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$). La menor cantidad de fenoles totales se observó en el extracto EPE el cual tuvo una diferencia significativa por debajo de las muestras mencionadas anteriormente. Esta variación puede deberse a la vegetación que rodea los apiarios situados en los diferentes sitios muestreados, ya que se ha demostrado la influencia que tiene la región donde las abejas toman el propóleo sobre los compuestos biológicos (Banskota *et al.*, 2001). Sulaeman *et al.* (2019), utilizaron el mismo proceso de extracción que en este estudio (etanol 75 %) y obtuvieron valores semejantes reportando concentraciones de 10 mg EAG/gPs en los propóleos de Indonesia.

Por otro lado, otros estudios han reportado valores superiores a los encontrados en nuestra investigación, inclusive los propóleos evaluados en México. Esta diferencia posiblemente se deba a los solventes utilizados y métodos de extracción (Bucio y Martínez, 2017; Valencia *et al.*, 2012); así como, a los diversos ecosistemas del país, los cuales son influyentes en la calidad del propóleo. Las muestras evaluadas en nuestro estudio provienen del sur de Sonora, el cual se compone de zonas áridas y semiáridas contrario a las zonas boscosas y selváticas del sur del país quienes han reportado valores superiores (Delgado *et al.*, 2015; Socha *et al.*, 2015; Sulaeman

et al., 2019). Estudios previos de propóleos en Sonora han reportado la presencia de polifenoles en concentraciones de 427.9 a 601.8 mg equivalente de pinoembrina-galangina/g extracto, en dicho estudio también han demostrado variaciones en el contenido fenólico en el mismo estado de Sonora México, y que ese contenido también varía en las diferentes estaciones del año (Valencia *et al.*, 2012).

Flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides en los extractos etanólicos de propóleos, así como de los polifenoles totales, son considerados como un parámetro de calidad según la NOM-003 (SAGARPA, 2017). Se ha documentado que la concentración de los polifenoles depende del origen de la muestra y la actividad biológica se confiere a los flavonoides, por lo que hay una relación flavonoide-efecto biológico, clasificándose para el propóleo como producto bioactivo (Rivero y Martínez, 2015). En la presente investigación se demostró la presencia de flavonoides totales. La Figura 2 muestra el contenido de flavonoides totales presentes en las diversas muestras evaluadas de propóleo y se puede observar que el extracto EPFV presentó la mayor concentración de estas biomoléculas con un valor de 42.96 ± 1.74 mg EQ/g PS ($p < 0.05$). Por el contrario, el extracto EPE mostró la menor cantidad de flavonoides totales (2.11 ± 1.13 mg EQ/g PS). Lo anterior demuestra alta variabilidad de resultados dependiente del origen de recolección. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en los extractos de propóleo de Indonesia y Polonia con valores (0.76 - 3.39 mg/g QE), dichos estudios utilizaron el mismo solvente de extracción (Sulaeman *et al.*, 2019).

En otros estudios realizados en Jalisco, México se ha demostrado también la presencia de estos compuestos en donde se han reportado valores de 130 mg EQ/g mayores que los del presente estudio, sin embargo, son propóleos de regiones donde abunda la vegetación por sus climas húmedos (Delgado *et al.*, 2015). Por otra parte, se encontró un estudio reciente en donde se muestrearon propóleos de 11 zonas del sur de México quienes reportaron concentraciones de flavonoides que oscilaban entre los 0.04 y 4.04 %. En este estudio los métodos realizados fueron según la NOM-003-SAG/GAN-2017 (Rodríguez *et al.*, 2020), estos estudios demuestran también la presencia de flavonoides en los propóleos mexicanos.

Actividad antioxidante

Inhibición del radical DPPH (2,2 - difenil-1-picrilhidracil).

El método de DPPH está basado en la capacidad del radical para reaccionar con donantes de hidrógeno. La interacción de un antioxidante con el radical depende de su formación estructural con la presencia de grupos hidroxilo (Jiménez *et al.*, 2005).

En la Figura 3 se muestran los resultados antioxidantes de los diferentes propóleos medidos en μ mol ET/PS en donde el EPB obtuvo la mayor actividad antioxidante con un valor de 295.855 ± 11.432 μ mol ET/gPS seguido con dife-

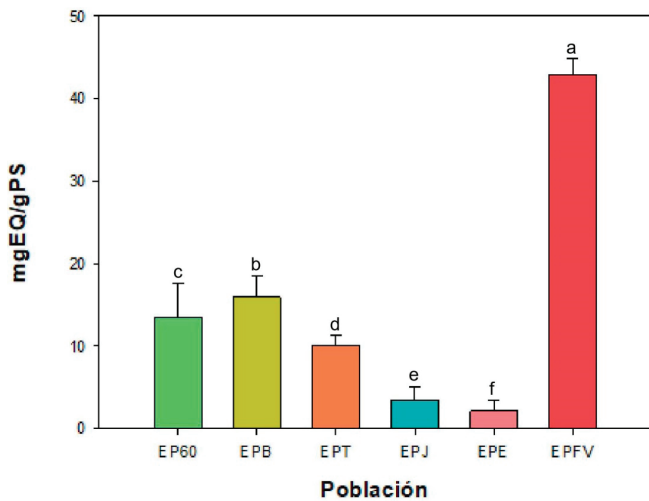


Figura 2. Contenido de flavonoides totales en extractos etanólicos de propóleos de diversas poblaciones del sur de Sonora. Media \pm desviación estándar (n=3).

Figure 2. Total flavonoid content in ethanolic extracts of propolis from different populations in southern Sonora. Mean \pm standard deviation (n=3).

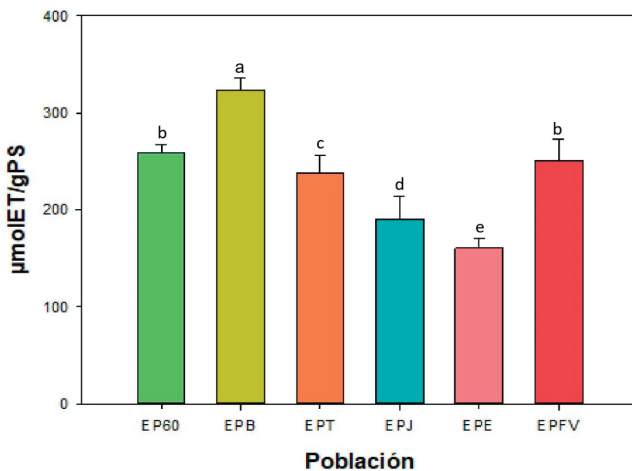


Figura 3. Capacidad antioxidante por medio del ensayo DPPH de extractos etanólicos de propóleos del sur de Sonora. Media \pm desviación estándar (n=3).

Figure 3. Antioxidant capacity by the DPPH assay of ethanolic extracts of propolis from southern Sonora. Mean \pm standard deviation (n=3).

rencias significativas por los extractos EP60 y EPFV quienes obtuvieron resultados de 259.465 ± 6.892 y 250.681 ± 20.939 $\mu\text{mol ET/gPS}$ respectivamente. El resto de los extractos también presentaron diferencias significativas entre sí en donde el menor valor lo obtuvo EPE con 160.584 ± 9.520 $\mu\text{mol ET/gPS}$. Estos resultados son mayores a los encontrados en propóleos mexicanos provenientes de los estados de Nayarit quienes presentaron valores de $138 \mu\text{g}$ equivalentes de Trolox (Ibarra *et al.*, 2020) y similares a los de Guanajuato en donde reportan valores de 54.4 mg ET/g PS (Hernández *et al.*, 2018).

Por otro lado, se puede mencionar una posible correlación al comparar estos resultados antioxidantes con la concentración de fenoles, ya que los extractos EPB y EPFV fueron quienes obtuvieron valores superiores en éstas dos determinaciones. Socha *et al.* (2015), mostraron que hay una

correlación significativa entre la mayor actividad antirradical hacia el DPPH en extractos de propóleos de Polonia con el contenido total de fenoles y flavonoides. De igual manera, en estudios de extractos de tomate se documentó una correlación positiva entre la actividad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos utilizando el método de Pearson, en donde estas biomoléculas reducen los niveles de radicales libres (Silva-Beltrán *et al.*, 2015).

Inhibición del radical ABTS (2,2' - azinobis (3- etilbenzotiazolona-6-sulfonato).

El ensayo de ABTS se basa en la transferencia de electrones, los diferentes compuestos antioxidantes presentes en los extractos donan uno o más electrones para reducir el radical a catión. Este método puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado (López de Lerma *et al.*, 2013).

En la Figura 4 se muestra la actividad antioxidante que presentaron los diversos extractos etanólicos, donde se puede observar que el extracto EPT obtuvo el mayor valor con 156.963 ± 4.119 $\mu\text{mol ET/g PS}$. Todos los resultados obtenidos en el presente estudio oscilan entre los 140 y 160 $\mu\text{mol ET/g PS}$ con diferencias significativas entre sí con excepción de los extractos EPB y EPJ. El extracto que obtuvo el menor valor fue el EPE con 143.280 ± 4.636 $\mu\text{mol ET/gPS}$. Cabe mencionar que las extracciones etanólicas en propóleos obtienen resultados más favorables en estudios antirradicales en ensayos como ABTS incluso superiores a la extracción supercrítica, esto debido a que el etanol extrae mayores cantidades de polifenoles y flavonoides y, en consecuencia, una mayor capacidad antioxidante (Dantas *et al.*, 2017). Además, los resultados obtenidos en este estudio son menores que los que se presentaron en extractos de propóleos de Colombia, quienes tuvieron valores de 455 a 1091 $\mu\text{mol ET/g PS}$ utilizando como solvente etanol al 96 % (Palomino *et al.*, 2009). Sin embargo, son mayores a los que reportaron Narimane *et al.* (2017) 5.28 ± 0.16 $\mu\text{mol ET/g PS}$ quienes documentan una

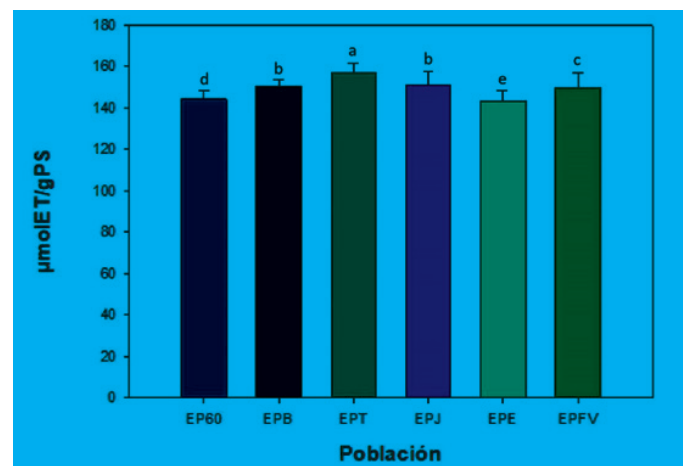


Figura 4. Capacidad antioxidante por medio del ensayo ABTS de extractos etanólicos de propóleos del sur de Sonora. Media \pm desviación estándar (n=3).

Figure 4. Antioxidant capacity by the ABTS assay of ethanolic extracts of propolis from southern Sonora. Mean \pm standard deviation (n=3).

correlación con el contenido total de fenoles y flavonoides en los extractos de propóleo analizados del noroeste de Argelia, donde se menciona que la capacidad de los extractos de propóleos para eliminar estos radicales podría ser por la donación de electrones, ya que esta propiedad conduce a la conversión de radicales libres en productos más estables finalizando la reacción en cadena de éstos radicales (Apak *et al.*, 2007).

Por otro lado, Gregori y Stevanato (2010) reportaron la correlación existente entre la estructura química de algunos componentes del propóleo (ácido cafeico y sus derivados CAPE y DMAC) y su capacidad antioxidante, indicando que la mayor actividad está dada por moléculas que tienen dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo aromático.

Capacidad antioxidante en el eritrocito humano

Recientes estudios, han utilizado modelos biológicos como eritrocitos humanos, con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante de diversas sustancias bioactivas sobre la peroxidación lipídica de las células (Quihui *et al.*, 2017). Este método está basado en la inducción de hemólisis generada por el radical AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). Este radical provoca la liberación del hierro desde la hemoglobina, actuando como pro-oxidante y generando hidroperóxidos provenientes de la reacción del oxígeno y el AAPH (Veiga *et al.*, 1997). Se detectó una protección eficaz de los extractos de propóleos analizados sobre los glóbulos rojos contra la hemólisis inducida por AAPH. La Figura 5 muestra que el extracto EP60 fue quien presentó el mayor porcentaje de inhibición de hemólisis con un 49.56 %, seguido del extracto EPJ, ambos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0.05$). EPE fue quien presentó la menor protección al eritrocito con un 23.79 %.

Estudios realizados por Woźniak *et al.* (2019) en extractos etanólicos de propóleos de Polonia utilizando también este modelo celular, obtuvieron inhibiciones de hemólisis del

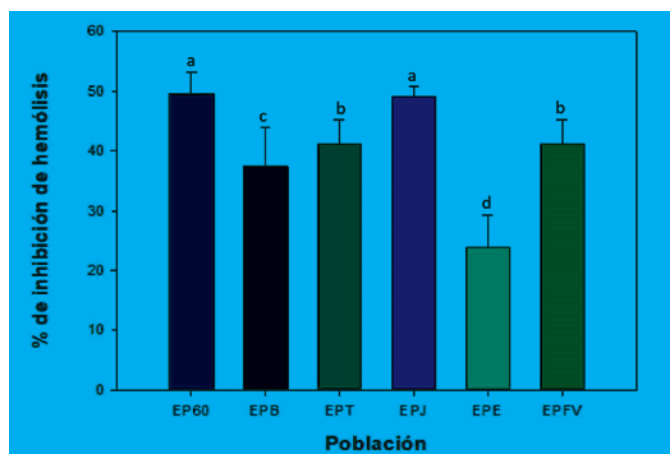


Figura 5. Capacidad antioxidante por medio del ensayo de % de inhibición de hemólisis inducida mediante AAPH de extractos etanólicos de propóleos del sur de Sonora. Media \pm desviación estándar (n=3).

Figure 5. Antioxidant capacity by the AAPH-induced % hemolysis inhibition assay of ethanolic extracts of propolis from southern Sonora. Mean \pm standard deviation (n=3).

46.14 y 48.65% respectivamente, por lo que los resultados de la presente investigación son superiores a los de los extractos de Polonia. En otras investigaciones en donde se utilizó el mismo método se evaluaron extractos de ramas de *Ziziphus obtusifolia* quienes obtuvieron porcentajes de inhibición de hemólisis del 46.3% y 36.8% (Silva *et al.*, 2019), los cuáles también fueron menores que los de este estudio.

El estrés oxidativo es una causa importante de lesiones celulares durante diversas patologías como la carcinogénesis. Estudios realizados en eritrocitos demostraron que compuestos fenólicos como derivados del ácido cafeico como CAPE y otros ésteres de ácidos polifenólicos relacionados, provocan efectos inhibitorios notables sobre la peroxidación lipídica en la membrana de los eritrocitos, sobre el rompimiento de cadenas de ADN celular y la fragmentación de proteínas (Wang *et al.*, 2008). Adicionalmente, se han realizado investigaciones en propóleos de Sonora en donde se ha detectado la presencia de CAPE (Hernández *et al.*, 2007), por lo que dicho compuesto podría ser el causante de la inhibición de hemólisis inducida en los extractos de propóleos del sur de Sonora.

Actividad antiinflamatoria por medio de la prueba de estabilidad de la membrana del eritrocito mediante las pruebas de hipotonicidad y de calor.

Durante la inflamación, hay lisis de lisosomas que liberan componentes enzimáticos, como la enzima fosfolipasa A2 que actúa sobre los fosfolípidos asociados a la membrana liberando lisolecitina. La lisolecitina actúa sobre la membrana de glóbulos rojos lo que causan una hemólisis que produce una variedad de trastornos. Esta lisis lisosomal se puede dar por sustancias nocivas como el medio hipotónico y por el calor (De *et al.*, 2017). La membrana de los glóbulos rojos humanos tiene una similitud con la membrana lisosomal. En este sentido, se trabajó con muestras de sangre, lo que permitió observar la actividad antiinflamatoria de los extractos de propóleos sobre los eritrocitos humanos mediante la inhibición hipotónica y la respuesta a la lisis inducida por calor a la membrana de los glóbulos rojos (Anosike *et al.*, 2018).

En la Tabla 2 se pueden observar los porcentajes de estabilización de los eritrocitos a causa de los diferentes extractos de propóleos analizados utilizando los ensayos por hipotonicidad y por calor. Así mismo, se observó alta variación en los resultados utilizando el medio hipotónico quienes mostraron porcentajes de estabilización de 7.74 a 1.77 % para los extractos EPT y EPJ respectivamente; sin embargo, mediante la prueba antiinflamatoria induciendo calor a los eritrocitos, se obtuvieron mejores resultados con valores del 22.01 (EP60) al 37.44 % (EPJ). Estos porcentajes demuestran que los propóleos evaluados son capaces de estabilizar la membrana de los glóbulos rojos, previniendo fugas de proteínas y fluidos séricos en los tejidos durante un periodo de mayor permeabilidad causada por mediadores inflamatorios que en este caso es el calor (Labu *et al.*, 2015).

La actividad antiinflamatoria presentadas en los propóleos se atribuye al alto contenido de compuestos fenólicos, esto debido a que existe un efecto sinérgico de más de

Tabla 2. Porcentajes de estabilización de la membrana del eritrocito utilizando calor y un medio hipotónico.

Table 2. Erythrocyte membrane stabilization rates using heat and hypotonic medium.

Extracto	Porcentaje de estabilización (%)	
	Calor	Hipotonicidad
EP60	37.19 ± 1.614 a	7.16 ± 2.416 a
EPB	27.72 ± 0.576 b	6.79 ± 1.740 a
EPT	24.75 ± 0.724 b	7.67 ± 0.413 a
EPJ	21.98 ± 0.445 c	1.74 ± 1.087 c
EPE	37.11 ± 0.623 a	7.719 ± 0.349 a
EPFV	34.35 ± 1.725 a	3.10 ± 1.181 b

Media ± desviación estándar (n=3)

Mean ± standard deviation (n=3)

un solo componente (Chandra *et al.*, 2012). Así mismo se ha reportado en muestras de propóleo la presencia de diversos compuestos como el ácido cafeico, CAPE, ácido ferúlico, galangina, genisteína, kaempferol, pinocembrina, quercetina y vainillina, entre otros (Castro *et al.*, 2014) confirmando la actividad antiinflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro* (Valenzuela-Barra *et al.*, 2015). Se puede observar que los propóleos son más efectivos estabilizando a los eritrocitos en medios con temperaturas elevadas que en medios hipotónicos. Anosike *et al.* (2018) indican que el efecto hemolítico que se produce en una solución hipotónica está relacionado con la acumulación excesiva de líquido dentro de la célula, lo que resulta en la ruptura de su membrana, por lo que la lesión de la membrana de los glóbulos rojos hará que la célula sea más susceptible a algún daño secundario a través de la peroxidación lipídica como la que es inducida por radicales libres.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana fue medida por los métodos de susceptibilidad bacteriana mediante la medición de halos de inhibición y por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) donde se realizaron diluciones de los extractos para determinar el porcentaje de inhibición

bacteriana. En la Tabla 3 se pueden observar los diferentes extractos evaluados con las diversas bacterias, en donde se muestra que todos los extractos presentaron actividad antibacteriana ante las diversas cepas confrontadas. Los extractos presentaron halos de inhibición con valores de 8 hasta 11.3 mm, siendo efectivas las diluciones de 1 y 2 mg de extracto/mL en la CMI. Así mismo, se observó que la bacteria Gram (+) *S. aureus* fue más sensible a los propóleos evaluados y los extractos EPB y EPE fueron quienes mostraron los mayores halos de inhibición con valores de 10.6 mm para las diluciones de 1 mg de extracto/mL. Estos resultados coinciden con Torlak y Sert (2013), en donde se evidenció efecto inhibitorio en bacterias Gram positivas al utilizar concentraciones de extractos de propóleos de 2 mg/mL. Otros estudios realizados en propóleos colombianos han comprobado la efectividad para reducir la contaminación por *S. aureus* con halos de inhibición de hasta 13 mm (Gómez *et al.*, 2014). En ese sentido, se observa que la actividad antibacteriana del propóleo es mayor contra las bacterias Gram positivas, y esto posiblemente se deba a la presencia de flavonoides, ácidos y ésteres aromáticos en la resina. Se ha comprobado que estos compuestos tienen efectos sobre las paredes celulares de estos microorganismos (Bankova *et al.*, 1999).

Por otro lado, las bacterias Gram negativas *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* presentaron mayor resistencia ante estos extractos ya que en su mayoría se obtuvieron valores de inhibición de menor diámetro (entre 8 y 9.3 mm) y se necesitó la dilución mayor (2 mg/mL) para inhibir su desarrollo. Además, al igual que en el presente estudio se ha evidenciado la actividad contra *S. typhimurium* utilizando concentraciones de extractos etanólicos de propóleos de 1 mg/mL (Choi *et al.*, 2006). Dado que las bacterias Gram (-) tienen dos membranas plasmáticas, la exterior que cubre la pared celular, podemos suponer que los ácidos fenólicos no podrían penetrar tan fácilmente la membrana exterior. En cambio, las bacterias Gram (+) no tienen esta membrana externa por lo que puede actuar de manera directa en las paredes celulares (Brown *et al.*, 2015). La mayor inhibición fue registrada por EPB quién a su vez presentó las mayores concentraciones de fenoles y flavonoides. Se observó una correlación de las actividades antibacterianas del propóleo

Tabla 3. Actividad antibacteriana de extractos de propóleos del sur de Sonora.

Table 3. Antibacterial activity of propolis extracts from southern Sonora.

Muestra	<i>E. coli</i> O157 : H7		<i>E. coli</i> O157		<i>S. aureus</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	Diámetro de inhibición (mm)	CMI	Diámetro de inhibición (mm)	CMI	Diámetro de inhibición (mm)	CMI	Diámetro de inhibición (mm)	MIC
EP60	n.d.	2a	n.d.	1 a	n.d.	1 a	n.d.	1 a
EPB	9 ± 1.15 a	2a	8 ± 1.15 a	2 a	10.6 ± 1.57 a	1 a	9 ± 2.98 a	2 a
EPT	9 ± 3.46 a	2a	9 ± 0.57 a	2 a	9.3 ± 0.57 a	2 a	8 ± 1.23 a	1 a
EPE	8 ± 2.68 a	2a	9 ± 0.57 a	2 a	10.6 ± 2.23 a	1 a	9.3 ± 3.34 a	2 a
EPJ	8 ± 0.57 a	1a	8 ± 2.05 a	2 a	11.3 ± 0.23 b	2 a	8 ± 0.57 a	2 a

Medias de tres repeticiones; n.d.: no determinado; CMI: Concentración mínima inhibitoria (mg de extracto/mL);

Means of three replicates; n.d.: not determined; CMI: Minimum inhibitory concentration (mg extract/mL)

con las concentraciones de fenoles y flavonoides, los cuales eran dependientes del origen de la muestra (Hamasaka *et al.*, 2004). Algunos de los mecanismos antimicrobianos que pueden presentar los flavonoides (compuestos detectados en los propóleos del presente estudio) son la inhibición de la motilidad, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de las funciones de la membrana citoplasmática, inhibición del metabolismo energético, inhibición de la unión y formación de biopelículas, inhibición de las porinas y atenuación de la patogenicidad (Xie *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

La actividad biológica de los extractos etanólicos de los propóleos del sur de Sonora fue dependiente de la zona de origen. Las mejores actividades antioxidantes, anti hemolíticas y antibacterianas fueron dadas por los extractos EPFV y EPB quienes a su vez mostraron la mayor concentración de fenoles y flavonoides totales. La actividad antiinflamatoria de los propóleos fue expresada por la protección térmica que mostraron los diferentes extractos a los eritrocitos para evitar la hemólisis, siendo el EP60 el que presentó el mayor porcentaje de inhibición. Este resultado respalda la base para las formulaciones del propóleo del sur de Sonora y su uso como terapia natural alternativo.

AGRADECIMIENTOS

La universidad de Sonora proyecto de colaboración (USO313007158), Instituto Tecnológico de Sonora por las facilidades brindadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Ayala, F. J., Rejón-Peraza, M. E., Cauich-Rodríguez, J. V., Borges-Argáez, R., Pinzón-Te, A. L., González-Alam, C. J. y Aguilar-Perez, F. J. 2019. Biophysicochemical study of propolis and its clinical and radiographic assessment in dental pulpectomy. *Drug Invention Today*, 12, 2928-2933.
- Anosike, C.A., Igboegwu, O.N. y Nwodo, O.F.C. 2018. Antioxidant properties and membrane stabilization effects of methanol extract of *Mucuna pruriens* leaves on normal and sickle erythrocytes. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2017.08.002>
- Andrews, M.J. 2001. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (Suppl 31), 5-16.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Esin-Celik, S., Bertasoglu, B., Berker I. y Özyrt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I. y Kujumgiev A. 1999. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales del propóleo brasileño. *Fitoterapia*. 70, 190-193.
- Bankova, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y. y Kadota, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15(7), 561-571.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R. y Casadevall, A. 2015. A través de la pared: vesículas extracelulares en bacterias Gram-positivas, micobacterias y hongos. *Nature Review Microbiology*. 13, 620-630. pmid: 26324094.
- Bucio-Villalobos, C. M. y Martínez-Jaime, O. A. 2017. Antibacterial activity of aqueous extract of propolis from Irapuato, Guanajuato, Mexico. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 223-227.
- Carrillo, M.L., Castillo, L.N. y Mauricio, R. 2011. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información Tecnológica*, 22, 21-28.
- Castro, C., Mura, F., Valenzuela, G., Figueroa, C., Salinas, R., Zúñiga, M. C., Torres, J.L., Fuguet, E. y Delporte, C. 2014. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Research International*, 64, 873-879.
- Chandra, S., Dey, P., Bhattacharya, S., Division, P. y Bengal, W. 2012. Preliminary in vitro assessment of anti-inflammatory property of *Mikania scandens* flower extract. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 2(1), 25-31.
- Chen, L., X. Xin., Q. Yuan., D. Su. y W. Liu. 2014. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (2), 180-188.
- Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M. y Kim, J.M. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*, 39(7), 756-761.
- Dantas Silva, R.P., Machado, B.A.S., Barreto, G.D.A., Costa, S.S., Andrade, L.N., Amaral, R.G. y Umsza-Guez, M.A. 2017. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos One*, 12(3), e0172585.
- De, P., Sarkar, S. y Mukhophadhyay, M.J. 2017. Study the antioxidant and In vitro Anti-inflammatory activity by membrane stabilization method of *Amaranthus gangeticus* leaf extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 103-105.
- Delgado-Aceves, M.D.L., Andrade-Ortega, J.Á. y Ramírez-Barragán, C.A. 2015. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 74-87.
- Gil, M., Reyes, D., Rojas, T. y Flores, M. 2008. Actividad bacteriostática y bactericida de una tintura de propóleos proveniente del Estado Cojedes sobre bacterias de interés clínico. *Boletín Venezolano de Infectología*, 19(2), 124.
- Gómez, J., Peña, N., Pérez, C., Gutiérrez, C. y Suarez, H. 2014. Evaluación por dos métodos in vitro de actividad antimicrobiana de propóleos frente a algunos microorganismos de interés alimentario. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 67(2), 131-134.
- Gregori, E. y Stevanato, R. 2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*, (48), 76-82.
- Hamasaka, T., Kumazawa, S., Fujimoto, T. y Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *Food Science and Technology Research*, 10(1), 86-92.

- Hernández, M.S., Abraham M.R., Cerón A., Ozuna C., Gutiérrez J.A., Segoviano J.J.N. y Avila, F. 2018. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology Campinas*. 38(2), 210-215.
- Hernández, J., Goycoolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z. y Lugo, E. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica*, 73(14), 1469-1474.
- Ibarra-Espain, J. I., Carmona-Gasca, C. A., Escalera-Valente, F. y Avila-Ramos, F. 2020. Efecto del propóleo y aceite de orégano adicionados en la dieta sobre parámetros productivos, leucocitos, metabolitos en sangre y estabilidad oxidativa de la pechuga de pollo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(1), 153-166.
- Jiménez, N., Londoño, J. y Arango, G. J. 2005. Actividad captadora de radicales libres y citotoxicidad de plantas colombianas de la familia Annonaceae. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(3), 337.
- Labu, Z. K., Laboni, F. R., Al Mamun, M. M. A. y Howlader, M. S. I. 2015. Antidiarrhoeal activity and total tannin content of ethanolic leaf extract of *Codiaeum variegatum*. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 87-90.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Esumi, H. y Kadota, S. 2010. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal of Natural Products*, 73(4), 623-627.
- Londono, A., Avila-Acebedo, J.G., Canales-Marinez M., Hernandez, C.T., Serrano R.P., *et al*. 2010. Antibacterial comparative study between extracts of mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, 1250-1254.
- López de Lerma, N., Peinado, J. y Peinado, R. 2013. In vitro and in vivo antioxidant activity of musts and skin extracts from off-vine dried *Vitis vinifera* cv. "T empranillo" grapes. *Journal of Functional Food*. 5(2), 914-922.
- Mello, B. C. y Hubinger, M. D. 2012. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different p H values. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(12), 2510-2518.
- Moein, S. y Moein, M.R. 2010. Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(7), 517-521.
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A. y Salah, R. 2017. Correlación entre la actividad antioxidante y el perfil de ácidos fenólicos y el contenido de propóleos argelinos: influencia del disolvente. *Revista de Ciencias Farmacéuticas de Pakistán*, 30(4), 1417-1423.
- Niraimathi, V., Suresh, A. J. y Latha, T. 2011. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of azomethines of aryl oxazoles. *E-Journal of Chemistry*, 8(51), S392-S394.
- Palomino, L.R., García, C.M., Gil, J.H., Rojano, B.A. y Durango, D.L. 2009. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from antioquia (colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395.
- Palomino García, L. R., Martínez Galán, J.P., García Pajón, C.M., Gil González, J.H. y Durango Restrepo, D. L. 2010. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of propolis from municipality of La Union (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(1), 5373-5383.
- Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, G.G., Valbuena-Gregorio, E., Campos-García, J.C., Silva-Beltrán, N.P. y López-Mata, M.A. 2017. Membrana de Quitosano con Aceites Esenciales de Romero y Árbol de Té: Potencial como Biomaterial. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 255-264.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rivero-Cruz, B. y Martínez-Chávez, A. 2015. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous quantification of flavonoids markers in Mexican propolis. *Food Analytical Methods*, 8(2), 413-419.
- Rodríguez-Pérez, B., Canales-Martínez, M. M., Penieres-Carrillo, J.G. y Cruz-Sánchez, T.A. 2020. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30.
- Rodríguez, Y., Catalán, F.S., Rojano, B., Durango, D., Gil, J. y Loaiza, J.M. 2012. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 303-311.
- SAGARPA. 2017. NOM-003-SAG/GAN-2017, propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento, Diario Oficial de la Federación. Tomo DCCLXIX No. 6 :27-35.
- Sakat, S.S., Juvekar, A.R. y Gambhire, M.N. 2010. In vitro antioxidant and antiinflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2(1):146-155
- Silva, J.C., Rodrigues, S., Feás, X. y Estevinho, L.M. 2012. Actividad antimicrobiana, perfil fenólico y papel en la inflamación del propóleos. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (5), 1790-1795.
- Silva-Beltrán, N. P., Ruiz-Cruz, S., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Ornelas-Paz, J. D. J., López-Mata, M. A., ... y Márquez-Ríos, E. 2015. Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015:284071.
- Silva-Beltrán, N.P., Balderrama-Carmona, A.P., López-Cuevas, O., Portela-Márquez, M.A., Guez, U., & López-Mata, M. A. 2019. Actividad antioxidante y antimicrobiana de Barchata (*Zizhipus obtusifolia*). *Revista Bio ciencias*, 6.
- Singleton, V.L. y Rossi, A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Journal of Viticulture and Enology*. 16(48), 44-58
- Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W. y Sanguandeeikul, R. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of T hai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science & Technology*. 48(1), 22-27.
- Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M. y Juszczak L. 2015. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Products Research*. 29:416-422.
- Son, Y.R., Choi, E.H., Kim, G.T., Park, T.S. y Shim, S.M. 2016. Bioefficacy of Graviola leaf extracts in scavenging free radicals and upregulating antioxidant genes. *Food and Function*. 7, 861-871, doi:10.1039/c5fo01258a.
- Sulaeman, A., Marliyati, S.A. y Fahrudin, M. 2019. Actividad antioxidante y contenido fenólico total del propóleo de abeja sin aguijón de Indonesia. *Revista de Ciencia Apícola*, 63(1), 139-147.
- Sultana, B., Anwar, F. y Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167-2180.

- Torlak, E. y Sert D. 2013. Antibacterial effectiveness of chitosanpropolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 52-55.
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J. C., Salas-Reyes, M., ... y Velazquez, C. 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2), 645-651.
- Valenzuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., de las Heras, B., Hortelano, S. y Delporte, C. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 37-44
- Veiga, E., Aguilar J.A., Clavo B., y Llanes L. 1997. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos*, (22), 201-216
- Wang, T., Chen, I., Wu, w., Long, Y. y Wang, R. 2008. Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86, 279-287.
- Woźniak, M., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Rogoziński, T., y Ratajczak, I. 2019. Perfil fenólico y actividad antioxidante de los extractos de propóleos de Polonia. *Comunicaciones de Productos Naturales*, 14(5), 1934578X19849777.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., y Ren, L. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132-149.

Production of extracellular lipase by *Enterococcus faecium* E68 with olive oil waste as substrate

Producción de lipasa extracelular por *Enterococcus faecium* E68 en residuos de aceite de oliva como sustrato

Merih-Kivanc, Esra Acu*

Eskisehir Technical University, Science of Faculty, Department of Biology, Eskişehir, Turkey

ABSTRACT

Green technologies eliminate the damages caused by agro-technological wastes to the environment. Our study aimed to both prevent the environmental harm by olive oil waste, and produce lipase enzyme, which is an important biotechnological product. *E. faecium* E68 obtained from milk and dairy products was used for lipase enzyme production. *E. faecium* E68 was cultured in lipase production medium containing 10 % olive waste, pH 6.5, at 37 °C with 120 rpm agitation for 48 h. The effect of temperature, pH metal ion, surfactant, and NaCl was also determined. The molecular weight of the partially purified extracellular lipase enzyme was estimated to be around 19-20 kDa by SDS-PAGE. The optimum temperature was 45°C, while the enzyme exhibited appreciable thermostability retaining activity at 55°C for 48h. The optimum lipase activity was at pH 10. One mM Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ and K⁺ ions modulated the enzyme activity, but was inhibited by Hg²⁺, SDS and Triton X-100. The enzyme is halophilic and 25 % NaCl salt increased the activity.

Keywords: *Enterococcus faecium*, Lipase activity, Olive oil waste, lipase.

RESUMEN

Con las tecnologías verdes se eliminan los daños que ocasionan los desechos agrotecnológicos al medio ambiente. En nuestro estudio, el objetivo era prevenir el daño de los residuos de aceite de oliva al medio ambiente y producir la enzima lipasa, que es un producto biotecnológico importante. *E. faecium* E68 obtenido de leche y productos lácteos se utilizó en la producción de la enzima lipasa. *E. faecium* E68 se desarrolló en medio de producción de lipasa con un 10 % de orujo de aceituna, pH 6,5, a 37 °C con agitación a 120 rpm durante 48 h. También se determinó el efecto de la temperatura, el pH del ion metálico, el surfactante y el NaCl. El peso molecular de la enzima lipasa extracelular parcialmente purificada se estimó en alrededor de 19-20 kDa mediante SDS-PAGE. La temperatura óptima fue de 45 °C, mientras que la enzima exhibió una termoestabilidad apreciable reteniendo la actividad a 55°C durante 48 h. La actividad óptima de la lipasa fue a pH10. Los iones Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ y K⁺ (1 mM) modularon la actividad de la enzima, pero fueron inhibidos por Hg²⁺, SDS y Triton X-100. La enzima es halófila y la sal de NaCl al 25 % aumentó la actividad.

Palabras clave: *Enterococcus faecium*, actividad de lipasa, residuos de aceite de oliva, lipasa.

INTRODUCTION

By-products generated in the agricultural industry cause much environmental pollution and adverse health effects (Hamrouni *et al.*, 2020; Leite *et al.*, 2021). Waste resulting from olive oil extraction creates severe environmental problems with its highly polluting properties (Mantzavinos and Kalogerakis, 2005; Sarika *et al.*, 2005). Olive waste contains biodegradable compounds and phytotoxic phenolic compounds. Phytotoxic wastes correspond to about 80 % of olive oil production. These phenols tend to change into condensed high molecular weight polymers, which are difficult to degrade on storage (Ayed *et al.*, 2005). For these reasons, olive oil wastes may lead to acute odor problems and, more importantly, serious risks for water and soil quality (Mantzavinos and Kalogerakis, 2005; Sarika *et al.*, 2005). Today, with the increasing awareness of environmental protection, the use of biomass has gained importance (Hamrouni *et al.*, 2020). Olive oil waste contains simple and complex sugars, lipids, residual oil, proteins, and mineral elements, besides phytotoxic wastes. These compounds can be directly recovered by chemical extraction followed by purification (Fki *et al.*, 2005; Papadimitriou *et al.*, 2005). Olive oil waste can be used as the basic compound for fermentative production processes (Fenice *et al.*, 2003; Angenent *et al.*, 2004). Various agro-industrial wastes have been used for biotechnological purposes, especially for enzyme production (Mahanta *et al.*, 2008). Lipases are one of those enzymes, which are commercially important since they catalyze the hydrolysis of long chain fatty acids to glycerol and fatty acids.

Most commercial lipases are produced by microorganisms (Babu and Rao, 2007; Treichel *et al.*, 2010; Bharathi and Rajalakshmi, 2019; Adetunji and Olaniran, 2021). Especially since the lipase enzyme produced from lactic acid bacteria is considered safe, it is preferred in the food industry (Meyers *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002; Couto and Sanroman, 2006; Ramakrishnan *et al.*, 2013; 2015; 2016; Sukohidayat *et al.*, 2018; Dellali *et al.*, 2020; Acu *et al.*, 2021).

In our study, it was aimed to produce, partially purify and characterize the lipase enzyme from *E. faecium* E68 strain in olive oil waste.

*Autor para correspondencia: Merih Kivanc
Correo electrónico: mkivanc@eskisehir.edu.tr

Recibido: 12 de mayo de 2022

Aceptado: 8 de agosto de 2022

MATERIAL AND METHODS

Bacteria

In the study, *Enterococcus faecium* obtained from Eskişehir Technical University microbiology unit was used. *E. faecium* E68 was inoculated in M17 broth and incubated at 37 °C for 24 h under 10 % CO₂ conditions. Growing cultures from M17 broth were inoculated on M17 agar and incubated at 37 °C for 24 h under 10 % CO₂ conditions. The morphological features of the colonies formed after incubation were examined. Then, the purity of the cultures was checked by microscopic examination by Gram staining.

Olive oil waste

Olive oil waste with dry matter content of 0.82 g, nitrogen content of 1.593 % and oil content of 0.036 % was obtained from olive oil production facilities and used in the studies.

Lipase production

E. faecium E68 was inoculated onto M17 agar and incubated at 37 °C for 48 h. It was then inoculated as a single colony into M17 broth and incubated at 37 °C for 24 h. Culture was set to an Optical Density (OD) of 1 at 600 nm in the spectrophotometer. Then, 1 % of the culture was inoculated into the lipase determination medium.

The study was carried out in 2 parts. In the first part, without adding olive oil waste to the medium, and in the second part, by adding 10 % olive oil waste to the medium.

For enzyme production, 500 mL of lipase assay medium was prepared, added with 5 % peptone as nitrogen source, 3 % glucose as carbon source and other components (0.1g/L CaSO₄, 0.5g/L KH₂PO₄, 0.1g/L MgSO₄ x 7H₂O, 1 % tributrine) and the pH adjusted to 6.5-7. It was incubated for 48 h in a 37°C shaking oven (120 rpm) under 10 % CO₂ conditions. After incubation, it was centrifuged at 9,798 x g for 30 min at 4 °C. The cooled acetone was mixed with the obtained filtrate at a 1:5 ratio, kept at 4 °C for 24 h, and centrifuged at 9,798xg, 4 °C for 15 min.

In the application where olive oil waste is used, the same processes were applied by adding 10 % olive waste to the lipase medium (0.1 g/L CaSO₄, 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 1 % tributrine).

Then, 3 mL of the enzyme was placed into the dialysis tube (Sigma PURX12015), which in turn was placed in Tris HCl buffer. Tris HCl buffer was changed every 24 h. After 48 h, partially purified enzyme was obtained. Partially purified enzymes were used in the experiments. Experiments were carried out in two replicas each.

Assay of lipase activity

Para-nitrophenyl palmitate (p-NPP) method, which is a spectrophotometric method, was used for lipase activity determination (Arora, 2013). This method determined lipase activity by measuring p-NPP at a wavelength of 405 nm in a spectrophotometer. One unit (U) of lipase activity is the amount of enzyme that releases 1 μmol p-nitrophenol per unit time (min).

Determination of the molecular weight of lipase

The protein amount of the lipase enzyme was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) in a spectrophotometer at 590 nm using Coomassie Brilliant Blue G-250 dye. The molecular weight of the enzyme was determined by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) according to the method of Laemmli (1970).

Determination of Factors Affecting Partially Purified Extracellular Enzyme Activity

Effect of temperature and pH on enzyme activity

To determine the effect of temperature on partially purified extracellular enzyme activity, the enzyme was incubated for 1 h at 5 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 55 °C and 65 °C in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7).

To determine temperature stability, lipase enzyme was placed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) and incubated at 5 °C, 20 °C, 30 °C, 45 °C and 55 °C for 5 min, 1 h, 4 h, 24 h and 48 h. After cooling, the remaining enzyme activity was measured (Esteban-Torres *et al.*, 2015).

The effect of pH on lipase activity was determined by keeping the enzyme in buffers prepared between pH 3-11. Acetic acid-sodium acetate buffer was used for pH 3-5, sodium phosphate buffer for pH 6, Tris-HCl buffer for pH 7-8, and glycine NaOH buffer for pH 9 (Esteban-Torres *et al.*, 2015).

In order to determine the enzyme pH resistance, 200 μL of buffers at different pHs were placed in the microtubes. On top of it, 200 μL of enzyme were added and incubated at 45 °C for 2 and 3.5 h. The remaining enzyme activity was determined (Esteban-Torres *et al.*, 2015).

Effect of some surfactants and cations on enzyme activity

To determine the effect of some cations, surfactants, and solutions on the enzyme activity, MnCl₂, CuCl₂, MgCl₂, KCl, NiCl₂, CaCl₂, HgCl₂, and ZnCl₂ of 1 mM were added, and the enzyme activity determined at 405 nm in a spectrophotometer.

The effect of urea, EDTA, SDS, tween 20, tween 80, and triton X-100 on enzyme activity was determined by adding 1 μL to the medium (Esteban-Torres *et al.*, 2015, Ramakrishnan, *et al.*, 2016).

Effect of salt on enzyme activity

To determine the effect of sodium chloride (NaCl), it was added to the buffer at concentrations of 0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % (w/v) and the enzyme activity determined in spectrophotometer at 405 nm (Esteban Torres *et al.*, 2015).

RESULT AND DISCUSSION

In recent years, producing useful substances from waste materials has been of great importance. Thus, products with economic importance can also be obtained while preventing environmental pollution. In the study, it was determined that olive waste could be used in the nutrient medium and, in this way, a product of high economic importance can be obtained.

The extracellular lipase enzyme obtained without using olive oil waste and using 10 % olive oil was partially purified and used in the tests. The wet and dry weights and protein contents of the obtained lipase enzymes are given in Table 1.

Table 1. Dry weight and protein amounts of extracellular lipase enzymes from *E. faecium* E68.

Tabla 1. Peso seco y concentración proteica de las enzimas lipasa extracelulares de *E. faecium* E68

	Protein (BSA mg/mL)	Dry weight (mg/mL)	Wet weight (mg/mL)
Medium	0.315	0.396	1.078
Olive oil waste	0.691	0.360	1.133

The protein amounts in the extracellular enzymes were found to be 0.315 mg/mL for the lipase enzyme produced in the medium, while it was 0.691 mg/mL for the partially purified enzyme produced in olive oil waste.

As a result of *E. faecium* E68 SDS-PAGE analysis, the molecular weight of lipase enzymes was determined at around 19-20 kDa (Figure 1).

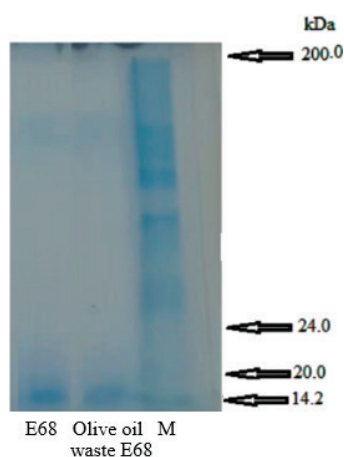


Figure 1. SDS-PAGE analysis of lipase enzymes from partially purified *E. faecium* E68. M. marker.

Figura 1. Análisis SDS-PAGE de enzimas lipasa de *E. faecium* E68 parcialmente purificado. Marcador M.

Lipase enzyme production was performed with *E. faecium* E68 in lipase medium containing 10 % olive oil waste (pH 6.5) after 48 h of incubation at 120 rpm at 37 °C.

Higher enzyme activity was obtained in the extracellular enzyme produced by *E. faecium* E68 in the fattening medium where olive waste was used. Lipid sources, such as natural oils have been shown to stimulate lipase production. Olive oil is one of the best inducers of lipase production (Zarevúcka, 2012). The presence of a certain amount of olive oil in olive oil waste stimulated lipase production. The activity of intracellular and extracellular lipases increases with increasing lipid concentration (Zarevúcka, 2012). The reason for the higher activity of the lipase enzyme produced using olive oil waste may be related to the increased lipid concentration.

The effects of temperature, pH, cations, and surfactants on the enzyme activity were determined.

The partially purified extracellular enzyme showed high lipolytic activity between 5 °C and 65 °C. The highest activity of the enzyme produced in the lipase medium was between 5 - 20 °C (Figure 2). Partially purified extracellular enzyme activity obtained with *E. faecium* E68 in olive waste was highest at 45 °C (Figure 2). Temperatures above 45 °C caused a decrease in enzyme activity (Figure 2). It has been reported that the partially purified extracellular enzyme obtained from *E. durans* E114 shows maximum activity at 30 - 45 °C (Acu *et al.*, 2021). Maximum activity in the *E. faecium* lipase enzyme was observed at 40 °C (Ramakrishnan *et al.*, 2016). Dellali *et al.* (2020) reported that the optimum lipase activity of *E. faecium* strains was 30-40 °C.

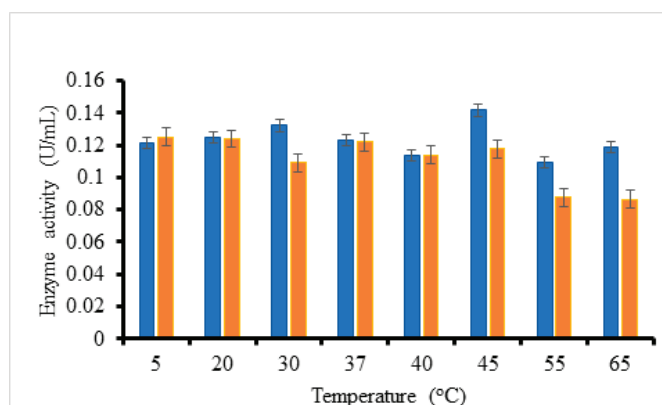


Figure 2. The effect of temperature on the *E. faecium* E68 extracellular lipase enzyme activity. ■ Olive oil waste, ■ medium.

Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la lipasa extracelular de *E. faecium* E68. ■ Residuos de aceite de oliva, ■ medio.

Partially purified enzyme activity produced in olive waste decreased at 20 °C and remained stable at 55 °C, although it was below the optimum activity. The lipase enzyme produced in the lipase medium maintained its activity at 20 °C (Figure 3). The temperature tolerance of the extracellular enzyme remained quite stable after an incubation period of 24-48 h at 30-45 °C. Ramakrishnan *et al.* (2016) reported that the *E. faecium* lipase enzyme activity is stable between 30-70 °C. Researchers have reported that the enzyme activity is stable at 80-100 °C, and that enzyme activity does not remain after 100 °C. Esteban Torres *et al.* (2015) observed that the maximum activity of the *L. plantarum* esterase enzyme is at 40 °C. They reported that the enzyme showed only 40 % of its activity at 5 °C, and, after 10 h of incubation at 55 °C and 65 °C, 40 % of the activity remained. Francisco *et al.* (2019) reported that the decrease in enzyme activity with temperature is associated with the change in its three-dimensional structure. It has been found that the alpha helix decreases at temperatures above 50 °C. At temperatures above 70 °C, the beta sheet increases while maintaining a low alpha helix. Opening the protein results in permanent inactivation and denaturation (Ismail *et al.*, 2021).

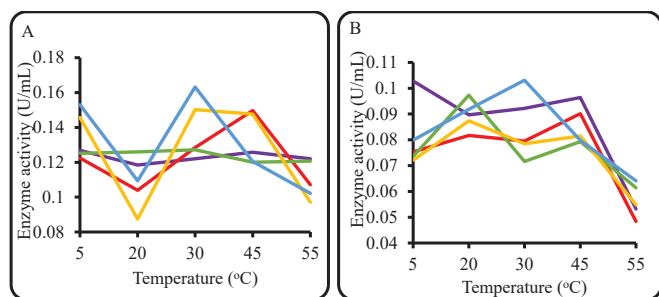


Figure 3. Temperature resistance of *E. faecium* E68 extracellular lipase enzyme according to different residence times at different temperatures. A; olive oil, B; Medium. — 5 min, — 1 h, — 4 h, — 24 h, — 48 h.

Figura 3. Estabilidad a la temperatura de la enzima lipasa extracelular de *E. faecium* E68. A; aceite de oliva, B; Medio. — 5 min, — 1 h, — 4 h, — 24 h, — 48 h.

The highest activity of the lipase enzyme, produced in olive waste and partially purified, was obtained at pH 10 (Figure 4). Partially purified enzymes were alkaline in nature. The optimum pH was found to be 10. While the lowest activity is obtained at pH 6, the enzyme has higher activity at pH 3. Acidic pH activity has been observed for a lipase from *E. durans* 27 isolated from fish processing waste. Lipase from ED-27 showed optimal activity at pH 4.6 and at temperature 30 °C (Ramakrishnan *et al.*, 2015). A highly alkaline extracellular lipase that exhibits maximum hydrolytic activity at pH 10.8 has been reported from *E. faecium* MTCC5695 (Ramakrishnan *et al.*, 2016). Dellali *et al.* (2020) reported that the optimum activity of the enzyme produced by *E. faecium* strains is between pH 6 and 9.

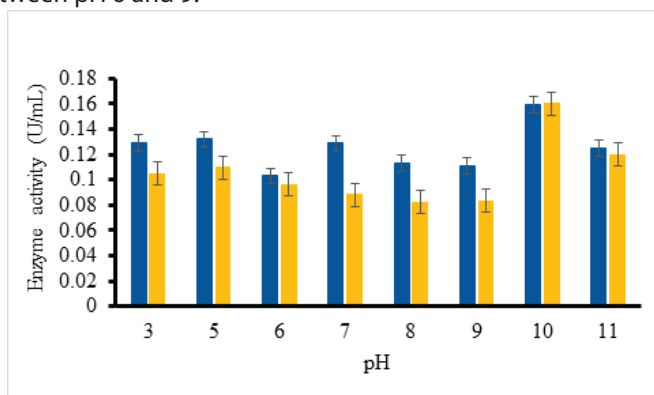


Figure 4. Effect of pH on the activity of the *E. faecium* E68 extracellular lipase enzyme. — Olive oil waste (U/mL), — Medio (U/mL)

Figura 4. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima lipasa extracelular de *E. faecium* E68. — Residuos de aceite de oliva (U/mL), — Medio (U/mL)

The pH stability of the extracellular enzymes obtained from *E. faecium* E68 was determined by incubating them at different pH values for 2 h and 3.5 h at 45 °C. The lipase produced in olive oil waste by *E. faecium* E68 remained significantly stable after 2 h and 3.5 h at pH 3 (respectively % 77,36 and % 70,79). However, the lipase activity produced in the lipase production medium was lower at pH 3. Similar acidic pH activity has been observed for a lipase from *E. du-*

rans NCIM5427 from fish waste isolated from slaughterhouse waste (Ramakrishnan *et al.*, 2015). For the enzyme produced in the lipase production medium, the activity loss was higher after 2 h and 3.5 h at pH 3. The highest loss of activity was observed at pH 5. Enzymes remained stable at alkaline pH for 2 h and 3.5 h of standing (Figure 5).

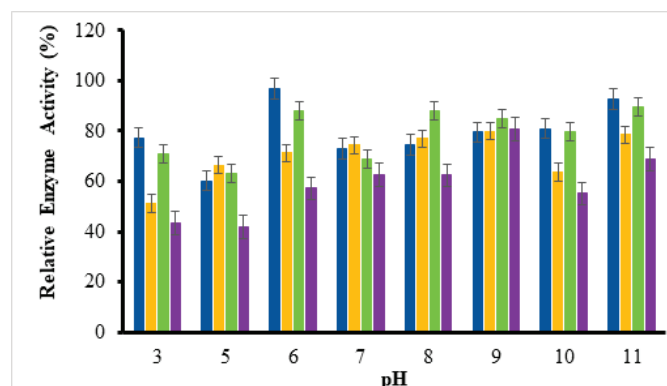


Figure 5. pH resistance of *E. faecium* E68 extracellular lipase enzyme according to different residence times (2 and 3.5 h) at different pH. — Olive waste 2 h, — Olive waste 3,5h, — Medio 2 h, — Medio 3,5 h.

Figura 5. Resistencia al pH de la enzima lipasa extracelular de *E. faecium* E68 según diferentes tiempos de residencia (2 y 3,5 h) a diferentes pH. — Residuos de aceituna 2 h, — Residuos de aceituna 3,5 h; — Medio 2 h, — Medio 3,5 h.

Lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus sp.* have also been observed. It showed optimum activity at pH 8.5 and was reported to be very stable at pH 6.0 - 8.0 (Nawani and Kaur, 2007).

The effects of some ions and additives on the enzyme activity are given in Table 2. One mM Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} and K^{+} ions significantly increased the lipase activities produced in olive oil wastes. Contrary to our findings, Ramakrishnan *et al.* (2015) reported that it significantly reduced Ca^{2+} and Mg^{2+} lipase activity. Mercury (Hg^{2+}) led to a strong decrease in lipase activity. In the lipase enzyme produced in the lipase environment, metals other than Mg decreased the enzyme activity (Table 2). EDTA, which can affect the interface region between substrate and lipase, increased enzyme activity, however, some studies have reported that it reduces activity (Sztajer *et al.*, 1992). The activity of lipase Lp_3562 was strongly inhibited by Hg^{2+} , Cu^{2+} and SDS (Esteban-Torres *et al.*, 2014a). Urea, Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} and SDS, inhibited the activity of the enzyme produced in the lipase medium. Similarly, Dellali *et al.* (2020) reported that although the effect of metal and additive ions on esterase activity varies from bacteria to bacteria, they inhibit SDS, NaN_3 , CuCl_2 , EDTA, AgNO_3 and HgCl_2 enzyme activity.

While Triton X-100 and Tween 80 of surfactants increased enzyme activity, Tween 20 and SDS decreased enzyme activity.

This enzyme has high salt resistance and shows halophilic properties, an important feature in the preparation of foods. Even an increase in enzyme activity was observed (Figure 6). The salt resistance of this enzyme is high, and it showed halophilic properties. This feature is important for the preparation of foods.

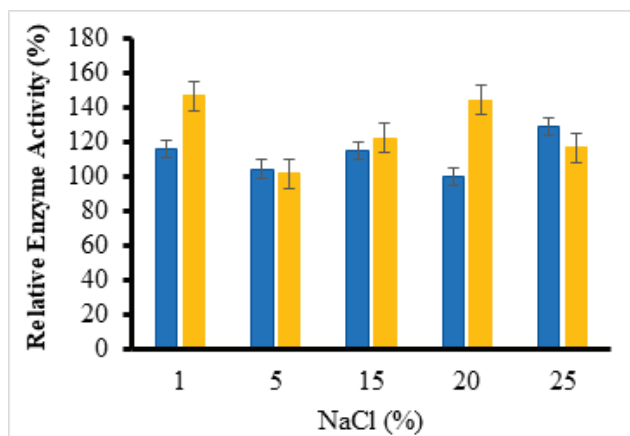


Figure 6. Effect of sodium chloride on the lipolytic activity of *E. faecium* E 68.

Olive oil waste; ■ medium.

Figura 6. Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad lipolítica de *E. faecium* E 68.

Residuos de aceite de oliva; ■ medio.

Table 2. Effect of additives on the lipolytic activity of *E. faecium* E 68.

Tabla 2. Efecto de aditivos sobre la actividad lipolítica de *E. faecium* E 68.

Additives	Relative activity (%)	
	Medium	Olive oil waste
Control	100	100
HgCl ₂	41.7	48.9
CaCl ₂	104.7	79.3
MnCl ₂	112.8	88.2
CuCl ₂	133.9	85.8
NiCl ₂	110.0	86.1
KCl	130.8	90.9
ZnCl ₂	105.2	89.2
MgCl ₂	150.9	123.3
EDTA	101.4	108.4
Urea	128.7	92.8
SDS	87.3	91.2
TritonX-100	81.5	120.5
Tween20	104.6	93.5
Tween80	105.4	128.5

The lipase enzyme produced in olive waste is promising in the food industry due to its resistance to 55 °C for 48 h, not losing its activity at low temperatures, and its halophilic properties. The use of these lipases is important as they can provide some advantages in food production.

The activity of lipase enzyme produced in olive oil waste was higher. The reason for this may be the presence of a small amount of olive oil residue in it. Olive oil has a significant effect for increasing lipase activity. It has been reported that the most suitable inducer in lipase production is olive oil. This has been associated with high levels of unsaturated grade free fatty acids, particularly oleic acid, in oil (Amenaghawon *et al.*, 2022). This has been shown to facilitate

cell growth and consequently increase both intracellular and extracellular lipase activity (Suci *et al.*, 2018). A similar observation was reported by Brozzoli *et al.* (2009) and Rajendran and Thangavelu (2012).

CONCLUSION

The results revealed that natural substrate such as olive oil waste has good inducing properties for lipase synthesis. Therefore, it may be beneficial to use olive oil waste as a cost-effective source for lipase production. The relative stability of *E. faecium* E68 lipase at high temperatures may make it usable for biotechnological processes, as enzymes that can withstand high temperatures longer, attract the attention of industries. It is important that the lipase enzyme produced by *E. faecium* E68 has high activity at 45 °C and pH 10, as well as showing activity in acidic conditions such as pH 3. It is promising in the food industry with its resistance to 55 °C for 48 h, its effectiveness at low temperatures and its halophilic feature. Olive oil can be an important substrate for waste lipase production. Thus, environmental pollution can be prevented, and a biotechnological product is also obtained.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Acu, E., Kılıç, V., and Kivanc, M. 2021. Production and characterization of extracellular lipase from *Enterococcus durans*. The J of Food 46(2):474-487 doi: 10.15237/gida.GD21020.
- Adetunji, A.I., and Olaniran, A.O. 2021. Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review. Braz J Microbiol 52(3):1257-1269. doi: 10.1007/s42770-021-00503-5.
- Amenaghawon, A.N., Orukpe, P.I., Nwanbi-Victor, J., Okedi, M.O., and Aburime, E.I. 2022. Enhanced lipase production from a ternary substrate mix of agricultural residues: A case of optimization of microbial inducers and global sensitivity analysis. Bioresour Technol Reports 17, 101000. doi: org/10.1016/j.biteb.2022.101000.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A., and Domiguez-Espinosa, R. 2004. Production of bioenergy and bio-chemicals from industrial and agricultural wastewater. Trends Biotechnol 22:477-485. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.07.001.
- Arora, P.K. 2013. *Staphylococcus lipolyticus* sp. nov., a new cold-adapted lipase producing marine species. Annals of Microbiology, 63(3), 913-922. doi: 10.1007/s13213-012-0544-2
- Ayed, L., Assas, N., Sayadi, S. and Hamdi, M. 2005. Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive millwastewaters by *Geotrichum candidum*. Lett Appl Microbiol 40:7-11. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01626.x.
- Babu, I.S. and Rao, G.H. 2007. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate. Research Journal of Microbiology, 2(5), 469-474. doi:10.3923/JM.2007.469.474.

- Bharathi, D., and Rajalakshmi, G. 2019. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification. *Biocatal Agric Biotechnol* 22:101368 doi:10.1016/j.bcab.2019.101368
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brozzoli, V., Crognale, S., Sampedro, I., Federici, F., D'Annibale, A., and Petruccioli, M., 2009. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresour. Technol.* 100, 3395-3402. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.022.
- Couto, S.R., Sanromán, M.A. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *J Food Eng.* 76: 291-302. doi:10.1016/J.JFOODENG.2005.05.022
- Dellali, A., Karam, Z.H. and Karam, N.E., 2020. Lipase and esterase activities of lactic acid bacteria isolated from different biotopes. *African J of Biotechnol* 19(4):156-164. doi: 10.5897/AJB2020.17106.
- Esteban-Torres, M., Mancheno, J. M., de las Rivas, B., and Munoz, R. 2015. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT-Food Sci and Technol*, 60(1): 246-252. doi:10.1016/J.LWT.2014.05.063
- Fenice, M., Sermanni, G.G., Federici, F., and D'Annibale, A., 2003. Submerged and solid-state bioprocesses for laccase and manganese-peroxidase production by *Panustigrinusson* olive-mill wastewater-based media. *J Biotechnol* 100:77-85. doi: 10.1016/s0168-1656(02)00241-9.
- Filipe, D., Fernandes, H., Castro, C., Peres, H., Oliva-Teles, A., Belo, I., and Salgado, J.M. 2020. Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid-state fermentation of olive pomace mixed with winery waste. *Biofuels Bioprod. Biorefining-Biofpr.* 14:78-91. doi: 10.1002/bbb.2073.
- Fki, I., Allouche, N. and Sayadi, S. 2005. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chem* 93:197 – 204. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2004.09.014
- Francisco, C.C., Luis, C.J., Marina, E.J., Javier, C.F., Alexis, L.A., Del Carmen, S.H., and Alfredo, R.I.. 2019. Effect of temperature and pH on the secondary structure and denaturation process of jumbo squid hepatopancreas cathepsin D. *Protein Pept Lett.* 26(7):532-541. doi: 10.2174/092986652666190405124353.
- Hamrouni, R., ClaeysBruno, M., Molinet, J., Masmoudi, A., Roussos, S., and Dupuy, N. 2020. Challenges of enzymes, conidia and 6-pentyl-alpha-pyrone production from solid state fermentation of agroindustrial wastes using experimental design and *T. asperellum* strains. *Waste and Biomass Valorization* 11:5699-5710. doi:10.1007/s12649-019-00908-2.
- Ismail, A.R., Kashtoh, H., and Baek, K.H. 2021. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: Biotechnological approaches and applications. *Int J Biol Macromol.* 187:127-142. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.101.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-885.
- Leite, P., Salgado, J.M., Venâncio, A., Domínguez, J.M., and Belo, I. 2016. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 214:737–746. doi: 10.1016/j.biortech.2016.05.028
- Leite, P., Sousa, D., Fernandes, H., Marta Ferreira, M., et al. 2021. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 27:100407. doi: 10.1016/j.cogsc.2020.100407.
- Liu, S.Q., Holland, R., Crow, V.L. 2001. Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal* 11:27-35. doi:10.1016/S0958-6946(01)00035-8.
- Lopes, M.F.S., Leitao, A.L., Regalla, M., Marques, J.J.F., Carrondo, M.J.T., and Crespo, M.T.B. 2002. Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *Int J of Food Microbiol* 76:107-115. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00013-2.
- Mahanta, N., Gupta, A., Khare, S.K. 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour. Technol.* 99, 1729-1735. doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.046.
- Mantzavinos, D. and Kalogerakis, N. 2005. Treatment of olive mill effluents. Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes. An overview. *Environ Int* 31:289-295. doi:10.1016/J.ENVINT.2004.10.005
- Meyers, S.A., Cuppett, S.L., and Hutkins, R.W. 1996. Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiology* 13(5):383-389. DOI:10.1006/FMIC.1996.0044
- Nawani, N., and Kaur, J. 2007. Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic bacillus sp: production, purification and biochemical characterization. *Enzym. Microb. Technol.* 40, 881-887. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.07.006.
- Papadimitriou, V., Maridakis, G.A., Sotiroidis, T.G. and Xenakis, A. 2005. Antioxidant activity of polar extracts from olive oil and olive mill wastewaters: an EPR and photometric study. *Eur J Lipid Sci Technol* 107:513-520. doi:10.1002/ejlt.200501165
- Rajendran, A., Thangavelu, V., 2012. Optimization and modeling of process parameters for lipase production by *Bacillus brevis*. *Food Bioprocess Technol.* 5, 310-322. doi:10.1007/s11947-010-0387-4
- Ramakrishnan, V., Goveas, L.C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P.M., Narayan, B. 2016. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 6:19-27. doi: 10.1016/j.bcab.2016.02.005
- Ramakrishnan, V., Goveas, L.C., Narayan, B., and Halami, P.M. 2013. Comparison of lipase production by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 and *Pediococcus acidilactici* MTCC 11361 using fish waste as substrate: optimization of culture conditions by response surface methodology. *ISRN Biotechnology ID* 980562, doi:10.5402/2013/980562
- Ramakrishnan, V., Goveas, L.C., Halami, P.M., Narayan, B. 2015. Kinetic modeling, production and characterization of an acidic lipase produced by *Enterococcus durans* NCIM5427 from fish waste. *J Food Sci Technol* 52(3):1328–1338 doi: 10.1007/s13197-013-1141-1145.

- Sarika, R., Kalogerakis, N. and Mantzavinos, D. 2005. Treatment of olive mill effluents. Part II. Complete removal of solids by direct flocculation with poly-electrolytes. *Environ Int* 31:297-304. doi:10.1016/j.envint.2004.10.006.
- Suci, M., Arbianti, R., Hermansyah, H. 2018. Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Institute of Physics Publishing, p. 12126. doi:10.1088/1755-1315/105/1/012126.
- Sukohidayat, N.H.E., Zarei, M. , Baharin, B.S., and Manap, M.Y. 2018. Purification and characterization of lipase produced by *Leuconostoc mesenteroides* Subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 using an aqueous two-phase system (ATPS) composed of triton X-100 and maltitol. *Molecules* 23, 1800; doi:10.3390/molecules23071800
- Sztajer, H., Lunsdorf, H., Erdmann, H., Menge, U., Schmid, R. 1992. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1124: 253-261. doi: 10.1016/0005-2760(92)90137-k.
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti M.A., Luccio, M.D., Oliveira, J.V. 2010. A Review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol* 3:182-196 doi: 10.1007/s11947-009-0202-2
- Zarevúcka, M. 2012. Olive Oil as Inductor of Microbial Lipase, Olive Oil- Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, Dr. Dimitrios Boskou (Ed.), ISBN: 978-953-307-921-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/olive-oil-constituents-quality-health-properties-and-bioconversions/olive-oil-as-inductor-of-microbial-lipase>.

Caracterización química y funcional de harinas de frijol crudo y cocido de las variedades Pinto Saltillo y Negro, procedentes del Estado de Durango

Chemical and functional characterization of raw and cooked bean flours from the Pinto Saltillo and Black varieties, from the State of Durango

Soto-Quiñones MC, Ochoa-Martínez LA*, González-Herrera SM, Rutiaga-Quiñones OM, González-Laredo RF

Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica, Blvd. Felipe Pescador 1830, Nueva Vizcaya, 34080 Durango, México

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue llevar a cabo la caracterización química y determinar la capacidad de absorción de agua y aceite de las harinas de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en el estado de Durango, México. Las harinas se obtuvieron a partir de frijol crudo y cocido. Los contenidos de proteína y almidón total fueron significativamente mayores en muestras cocidas que en crudas. Por el contrario, el contenido de almidón resistente disminuyó considerablemente en las muestras tratadas térmicamente, variando de 10.7 a 37.2 g/100 g en harinas de frijol crudo y de 6.6 a 9.3 g/100 g en harinas de frijol cocido. De manera general, el contenido de fibra dietaria total en harina de frijol crudo fue menor (37.2 a 53.9 %) que en harina de frijol cocido (33.9 a 56.4 %), incrementándose la fracción soluble de 4.7 a 8.9 % en las harinas cocidas. Las capacidades de absorción de agua y de aceite fueron mayores en las muestras cocidas. Este estudio aporta conocimiento sobre la composición química de las variedades de frijol estudiadas y la funcionalidad de sus harinas.

Palabras clave: Almidón, frijol cocido, frijol crudo, fibra dietaria, proteína.

ABSTRACT

The objective of the present work was to carry out the chemical characterization, and to determine the water and oil retention capacities, of flours from two common bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivated in the state of Durango, México. Flours were obtained from raw and cooked beans. Protein and total starch contents were significantly higher in cooked samples than raw flours. On the contrary, the resistant starch content decreased considerably in heat-treated samples, ranging from 10.7 to 37.2 g/100 g in raw beans flours and from 6.6 to 9.3 g/100 g in cooked beans flours. In general, the total dietary fiber content was lower in raw flour (37.2 to 53.9 %) than in cooked flour (33.9 to 56.4 %) with an increase in the soluble fraction between 4.7 to 8.9 % in cooked samples. The water and oil absorption capacities were higher in the cooked samples. This study contributes to the knowledge of the chemical composition of the two beans varieties studied and the functionality of their flours.

Keywords: Starch, cooked beans, raw beans, dietary fiber, protein

INTRODUCTION

Worldwide, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most widely consumed and cultivated legume due to their accessibility, high nutritional quality and low cost. Beans and corn are a fundamental part of the daily diet of most Mexicans. Common bean has been classified as an almost perfect food, since it is an excellent source of starch, protein, dietary fiber, minerals, vitamins, polyunsaturated fatty acids and a large number of bioactive compounds (Du *et al.*, 2014; Palacio-Márquez *et al.*, 2021). Depending on the variety, protein content varies from 14 to 33 %, while carbohydrate content ranges from 52 to 76 %, with starch being the main fraction of carbohydrates. The amount of total fiber (soluble and insoluble) varies from 29.0 to 46.8 %. It has a low content of lipids (1.0 – 2.8 %) (Kan *et al.*, 2017).

Castro-Rosas *et al.* (2016) studied the effect of the harvest year and the cultivar in the physical properties of the Bayo Victoria (BV), Negro San Luis (NSL) and Pinto Saltillo (PS) varieties and they found that the harvest year affected protein, crude fiber, ash and carbohydrate contents. The highest protein content was found in BV. Fernández-Valenciano and Sánchez-Chávez (2017) studied the physicochemical properties and nutritional quality of the main bean varieties consumed and produced in Mexico (Bayo, Negro, Peruano, Flor de mayo, alubia and pinto, as well as a green bean variety) finding significant differences in the nutritional content of the different bean varieties studied.

Heat treatment causes changes in the physicochemical characteristics of grains (Castro-Rosas *et al.*, 2016). Hence, it is interesting to know how the thermal process causes a significant alteration in the chemical composition of legumes. Sánchez-Velázquez *et al.* (2021) reported an increase in protein digestibility. Naozuka and Oliveira (2012) reported that thermal treatment, specifically domestic cooking, induced a perceptible decrease in the protein content. Ramírez-Cárdenas *et al.* (2008) showed that the protein concentration increased slightly as a consequence of the cooking effect and that the applied process affected the protein content,

*Autor para correspondencia: Luz Araceli Ochoa Martínez
 Correo electrónico: aocchoa@itdurango.edu.mx

Recibido: 13 de julio de 2021
 Aceptado: 6 de junio de 2022

depending on the cultivar. It has been reported that cooking reduced the resistant starch and increased the digestible starch (Corzo-Ríos *et al.*, 2020; Wainaina *et al.*, 2021), improved dietary fiber solubility and decreased insoluble dietary fiber (Chen *et al.*, 2014; Ullah *et al.*, 2018). Also, diverse authors have reported that the heat treatment enhanced the functional properties, including water absorption capacity and oil absorption capacity (Rocha-Guzman *et al.*, 2008; Peyrano *et al.*, 2016; Lin and Fernández-Fraguas, 2020).

In 2019, México was the seventh largest bean producer worldwide, with a production of 879,404 t, of which more than 60 % was obtained from the states of Zacatecas (29.2 %), Sinaloa (20.9 %), Nayarit (7.3 %), Chiapas (7 %), Chihuahua (7 %) and Durango (6 %) (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2020). The state of Durango stands out in the generation of bean varieties with a high impact from the productive and commercial point of view in Mexico (Rosales-Serna *et al.*, 2019). The most important commercial classes of beans produced in Durango are pinto, black, canario (garbanillo) and flor de mayo (Rosales *et al.*, 2009). The pinto bean, mainly the pinto Saltillo variety, is considered by farmers as the most important productive option due to its commercial success (Avila *et al.*, 2009; Rosales *et al.*, 2020b). The black bean is the second in productive importance (Rosales-Serna *et al.*, 2019). A gradual increase in the area cultivated with black beans has been observed since 2016, especially with the Negro San Luis variety. This variety is appreciated for its high yield potential and long shelf life of grains (Rosales *et al.*, 2020a).

The relevance of genetic variation in beans lies in its chemical characteristics, since depending on the genetic material, the nutritional and non-nutritional components will be found in higher or lower concentrations (Corzo-Ríos *et al.*, 2020). For this, it is important to know the differences in the chemical composition of the different bean varieties, which are caused by different cultivation conditions, locations, climates, etc., typical of each region, as they have an impact on the response to the processing conditions and to the consumer acceptance and preference.

In this context, the objective of this study was to evaluate the levels of moisture, starch, protein and dietary fiber, as well as functional properties such as water absorption capacity and oil absorption capacity, of flours from raw and cooked beans of two varieties commonly cultivated in Mexico, especially in the State of Durango.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The common bean samples were provided directly by farmers and were obtained from the 2016-2018 harvests at 13 different locations of the state of Durango, Mexico. Nine samples corresponded to Pinto Saltillo variety and were obtained from the towns of Alvaro Obregon (AO-PS), Calixto Contreras (CC-PS), Dr. Castillo del Valle (DCV-PS), Estación Progreso (EP-PS), Ignacio Ramírez (IR-PS), Jesús Agustín Cas-

tro (JAC-PS), Luis Moya (LM-PS), Ramón Corona (RC-PS) and Santa Catalina de Sena (SCS-PS). Four samples corresponded to the Black variety, obtained from Calixto Contreras (CC-B), Durango (DD-B) and Ignacio Allende (IA-B1 and IA-B2, harvested in 2016 and 2017, respectively). Once received, samples were stored in hermetic bags and refrigerated at 4 °C until analysis and processing.

Sample preparation

At least 1.5 Kg of bean grains from each locality were manually selected to remove external material, immature seeds, and damaged grains. Subsequently, they were washed with tap water and dried at room temperature. Each sample was divided into two batches; the first batch, without heat treatment (raw), was ground (IKA Werke Mill, MF10 Basic, 1 mm mesh) to obtain a flour with a particle size of 1 mm, and the second batch was subjected to heat treatment (cooked) in a conventional pressure cooker (14.7 psi) for 60 min (based in preliminary work). The cooked beans were frozen and lyophilised (Freeze Dry System, FreeZone 45, Labconco, USA; -45 °C, 0.133 mBar) and subsequently ground to a flour with a particle size of 1 mm.

Chemical determinations

The following measurements were performed in raw and cooked flour samples. Nitrogen content was determined by the Kjeldahl method (digestion, distillation and titration) (method A.O.A.C 979.09; A.O.A.C., 2005) using a micro Kjeldahl Labconco equipment. Protein content was determined using the conversion factor of 6.25. Moisture content was determined by the thermobalance method (NMX-F-428-1982). The contents of resistant starch (RS) and total starch (TS) were determined enzymatically (Megazyme enzyme kit K-RSTAR-100A 08/1, Megazyme, Ireland). The contents of total dietary fiber, soluble fiber and insoluble fiber were also determined enzymatically (Megazyme enzyme kit K-TDFR-200A 04/17, Megazyme, Ireland). Water absorption capacity (WAC), water absorption index (WAI) and oil absorption capacity (OAC) were determined at room temperature according to Rocha-Guzmán *et al.* (2008).

Statistical analysis

Each analysis was performed with at least two and in some cases up to four replicates. The results were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and the comparison of means was performed by Tukey's test, using the software package Minitab 18 (Version 18.1 for Microsoft Windows 10) with $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical composition

The contents of protein and moisture in raw- and cooked-bean flours are presented in Table 1. Protein content in Pinto Saltillo and Black flours ranged from 13.0 to 16.7 g/100 g. Cooking caused a slight increase (12.9 to 19.0 %)

Tabla 1. Contenido de proteína y humedad en harinas de frijol crudo y cocido de las variedades Pinto Saltillo y Negro (g / 100 g de muestra).**Table 1.** Protein and moisture content in raw and cooked bean flours of the Pinto Saltillo and Black varieties (g / 100 g of sample).

Sample	Protein		Moisture (Flour)	
	Raw	Cooked	Raw	Cooked
AO-PS	13.13 ± 0.00 ^{Ac}	15.13 ± 0.09 ^{Bbc}	8.70 ± 0.28 ^{Aef}	2.70 ± 0.14 ^{Bb}
CC-PS	12.97 ± 0.47 ^{Ac}	14.98 ± 0.48 ^{Abc}	11.65 ± 0.21 ^{Aa}	3.25 ± 0.49 ^{Bb}
DCV-PS	13.25 ± 0.62 ^{Ac}	14.89 ± 0.00 ^{Abc}	9.75 ± 0.07 ^{Accd}	3.35 ± 1.20 ^{Bb}
EP-PS	15.44 ± 0.96 ^{Aab}	17.19 ± 0.34 ^{Aab}	7.10 ± 0.42 ^{Ag}	2.70 ± 0.14 ^{Bb}
IR-PS	14.26 ± 0.01 ^{Abc}	12.89 ± 0.44 ^{Bc}	7.95 ± 0.21 ^{Afg}	6.60 ± 0.14 ^{Ba}
JAC-PS	14.87 ± 0.60 ^{Babc}	18.99 ± 0.14 ^{Aa}	11.15 ± 0.36 ^{Aab}	2.65 ± 0.21 ^{Bb}
LM-PS	14.07 ± 0.04 ^{Bbc}	15.83 ± 0.30 ^{Ab}	9.90 ± 0.00 ^{Accd}	3.45 ± 1.91 ^{Bb}
RC-PS	16.65 ± 0.74 ^{Aa}	15.85 ± 0.82 ^{Ab}	9.75 ± 0.07 ^{Accd}	6.50 ± 0.14 ^{Ba}
SCS-PS	14.18 ± 0.65 ^{Abc}	16.20 ± 0.95 ^{Ab}	8.80 ± 0.42 ^{Aef}	3.35 ± 1.06 ^{Bb}
CC-B	14.61 ± 0.007 ^{Bbc}	16.61 ± 0.00 ^{Aab}	11.05 ± 0.07 ^{Aab}	3.05 ± 0.21 ^{Bb}
DD-B	14.10 ± 0.13 ^{Abc}	14.46 ± 0.47 ^{Abc}	10.30 ± 0.00 ^{Abc}	3.90 ± 0.42 ^{Ba}
IA-B1	14.86 ± 0.02 ^{Aabc}	15.25 ± 0.23 ^{Abc}	9.00 ± 0.14 ^{Ade}	2.85 ± 0.07 ^{Bb}
IA-B2	15.48 ± 0.21 ^{Aab}	16.19 ± 1.94 ^{Ab}	10.55 ± 0.07 ^{Abc}	3.15 ± 0.07 ^{Bb}

Data represent the means ± standard deviation. Data connected by different capital letters in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments (raw and cooked). Data connected by different lowercase letters in the same column indicate statistical differences ($p < 0.05$) between varieties. Analyzes were performed in triplicate. (AO-PS: Alvaro Obregón-Pinto Saltillo; CC-PS: Calixto Contreras-Pinto Saltillo; DCV-PS: Dr. Castillo del Valle-Pinto Saltillo; EP-PS: Estación Progreso-Pinto Saltillo; IR-PS: Ignacio Ramírez-Pinto Saltillo; JAC-PS: Jesús Agustín Castro-Pinto Saltillo; LM-PS: Luis Moya-Pinto Saltillo; RC-PS: Ramón Corona-Pinto Saltillo; SCS-PS: Santa Catalina de Sena-Pinto Saltillo; CC-B: Calixto Contreras-Black; DD-B: Durango-Black; IA-B1: Ignacio Allende-Black 2016; IA-B2: Ignacio Allende-Black 2017).

in protein content. Similar results have been reported by Campos-Vega *et al.* (2009), and Wang *et al.* (2010). The highest protein content was found in the Pinto Saltillo variety, specifically in RC-PS (raw) and JAC-PS (cooked) samples. Heat treatment of legumes (such as cooking) improves protein quality due to inactivation of thermolabile anti-nutritional factors and the heat-induced structural changes that facilitate proteolysis (Wainaina *et al.*, 2021). The protein content increase in cooked-bean flours is attributed to the loss of soluble solids during cooking, increasing the availability of protein (Wang *et al.*, 2010).

The highest moisture content was observed in sample CC-PS (11.7 %), followed by JAC-PS (11.2 %). Senthilkumar *et al.* (2018) reported a moisture content of up to 15 % as the recommended optimum for storing raw beans for up to 1 year, which was met in our study. The differences found in moisture content are most likely related to crop, environmental conditions and soil characteristics (García-Díaz *et al.*, 2018).

The contents of resistant starch (RS) and total starch (TS) in raw- and cooked-bean flours are presented in Table 2. The highest values of resistant and total starch were found in the samples of the Pinto Saltillo variety. The samples with the highest contents of resistant starch were RC-PS (raw) and IR-PS (cooked). The RC-PS and CC-PS samples had the highest

contents of total starch, in raw and cooked form, respectively. The content of resistant starch was higher in raw samples. This suggests that heat generated during seed grinding was insufficient for starch gelatinization (García-Alonso *et al.*, 1998). The content of resistant starch in raw and cooked flours varied from 10.7 to 37.2 g/100 g and from 6.6 to 9.3 g/100 g, respectively. The total starch content ranged from 15.4 to 51 g/100 g in untreated samples and from 34.9 to 51.3 g/100 g in heat-treated samples, values similar to those reported previously (Wang *et al.*, 2010; Fabbri *et al.*, 2016).

The general increase in most starch fractions and reduction in resistant starch could be attributed to an improved availability and digestibility by effect of heat treatment, which caused deterioration or disruption of cell walls, resulting in gelatinization and dispersion of starch molecules making them more prone to digestive enzymes attack (Eyarú *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2016). The compositional variability observed for the tested samples might also be associated with differences in growing conditions. Furthermore, interactions between proteins and starch could further contribute to lower digestibility of legumes (Rebello *et al.*, 2014). Cooking reduces the resistant starch content and increases the Rapid Digestible Starch content (Wainaina *et al.*, 2021), however, the extent of this reduction varies with cooking methods. Yadav *et al.* (2010) reported a lower resistant starch content

Tabla 2. Contenido de almidón resistente y almidón total en harinas de frijol crudo y cocido de las variedades Pinto Saltillo y Negro (g / 100 g de muestra).

Table 2. Content of resistant starch and total starch in raw and cooked bean flours of the Pinto Saltillo and Black varieties (g / 100 g of sample).

Sample	Resistant Starch		Total Starch	
	Raw	Cooked	Raw	Cooked
AO-PS	18.96 ± 0.01 ^{Aef}	7.59 ± 0.50 ^{Ba}	24.87 ± 0.09 ^{Bde}	42.90 ± 1.26 ^{Abc}
CC-PS	24.42 ± 2.18 ^{Abcd}	7.17 ± 0.05 ^{Ba}	30.74 ± 2.00 ^{Bbc}	51.29 ± 0.90 ^{Aa}
DCV-PS	19.62 ± 0.21 ^{Adef}	6.74 ± 1.97 ^{Ba}	25.52 ± 0.54 ^{Bcde}	51.01 ± 3.53 ^{Aab}
EP-PS	13.73 ± 0.16 ^{Agh}	7.32 ± 0.08 ^{Ba}	23.02 ± 0.15 ^{Bef}	40.30 ± 0.89 ^{Abc}
IR-PS	20.87 ± 0.45 ^{Ade}	9.33 ± 1.55 ^{Ba}	28.26 ± 0.14 ^{Bcde}	35.74 ± 2.03 ^{Ac}
JAC-PS	28.14 ± 0.79 ^{Ab}	7.02 ± 0.24 ^{Ba}	34.63 ± 0.17 ^{Ab}	35.68 ± 3.89 ^{Ac}
LM-PS	26.37 ± 1.18 ^{A^bc}	7.45 ± 0.10 ^{Ba}	30.63 ± 1.94 ^{Abc}	34.86 ± 2.13 ^{Ac}
RC-PS	37.19 ± 2.44 ^{Aa}	7.51 ± 0.05 ^{Ba}	50.98 ± 1.98 ^{Ba}	38.39 ± 1.89 ^{Ac}
SCS-PS	17.42 ± 0.32 ^{Aefg}	6.62 ± 0.28 ^{Ba}	29.00 ± 1.98 ^{Ac^d}	36.44 ± 3.43 ^{Ac}
CC-B	11.86 ± 0.18 ^{Ah}	8.14 ± 0.76 ^{Ba}	18.47 ± 0.11 ^{Bfg}	42.16 ± 2.85 ^{Abc}
DD-B	10.76 ± 0.66 ^{Ah}	8.95 ± 0.92 ^{Aa}	15.42 ± 0.39 ^{Bg}	44.81 ± 2.21 ^{Aabc}
IA-B1	15.6 ± 0.53 ^{Afgh}	7.10 ± 0.93 ^{Ba}	26.46 ± 0.89 ^{Bcde}	41.85 ± 4.56 ^{Abc}
IA-B2	21.94 ± 2.46 ^{Acde}	7.46 ± 0.25 ^{Ba}	30.53 ± 2.94 ^{Bbc}	44.59 ± 3.89 ^{Aabc}

Data represent the mean ± standard deviation. Data connected by different capital letters in the same row indicate significant differences (p < 0.05) between treatments (raw and cooked). Data connected by different lowercase letters in the same column indicate statistical differences (p < 0.05) between varieties. Analyzes were performed in quadruplicate. (AO-PS: Alvaro Obregón-Pinto Saltillo; CC-PS: Calixto Contreras-Pinto Saltillo; DCV-PS: Dr. Castillo del Valle-Pinto Saltillo; EP-PS: Estación Progreso-Pinto Saltillo; IR-PS: Ignacio Ramírez-Pinto Saltillo; JAC-PS: Jesús Agustín Castro-Pinto Saltillo; LM-PS: Luis Moya-Pinto Saltillo; RC-PS: Ramón Corona-Pinto Saltillo; SCS-PS: Santa Catalina de Sena-Pinto Saltillo; CC-B: Calixto Contreras-Black; DD-B: Durango-Black; IA-B1: Ignacio Allende-Black 2016; IA-B2: Ignacio Allende-Black 2017).

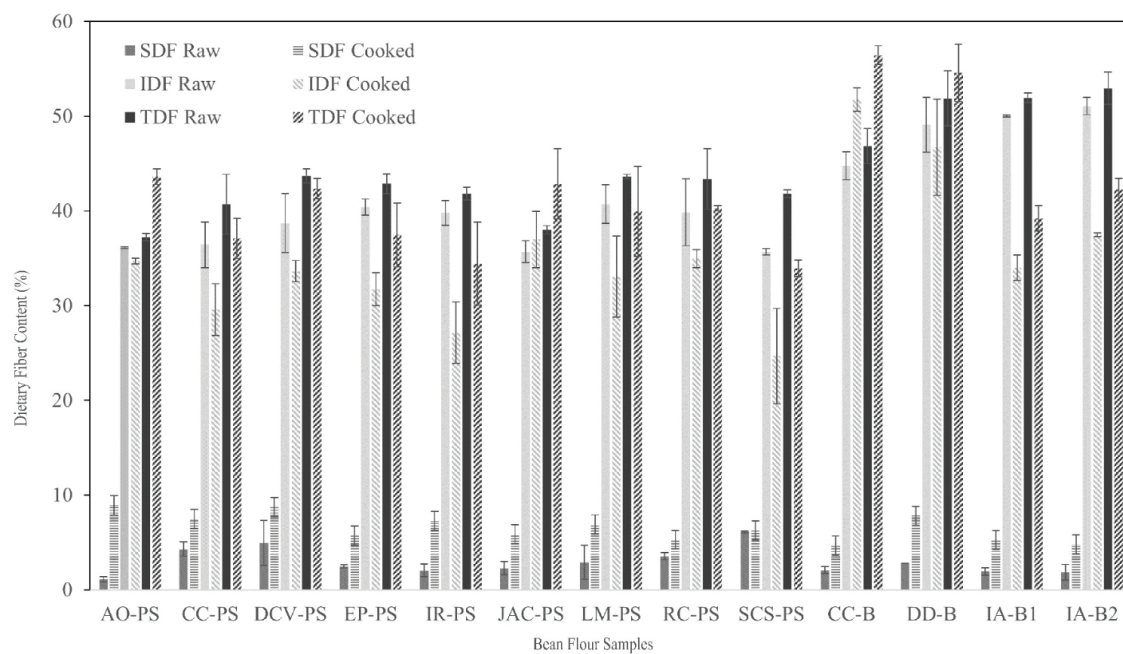


Figura 1. Contenido de fibra dietaria soluble (FDS), insoluble (FDI) y total (FDT) en harinas de frijol crudo y cocido de las variedades Pinto Saltillo y Negro.

Figure 1. Content of Soluble (SDF), Insoluble (IDF) and Total Dietary Fiber (TDF) in raw and cooked bean flours of the Pinto Saltillo and Black beans varieties.

Data indicate the mean ± standard deviation. Analyzes were performed in duplicate (AO-PS: Alvaro Obregón-Pinto Saltillo; CC-PS: Calixto Contreras-Pinto Saltillo; DCV-PS: Dr. Castillo del Valle-Pinto Saltillo; EP-PS: Estación Progreso-Pinto Saltillo; IR-PS: Ignacio Ramírez-Pinto Saltillo; JAC-PS: Jesús Agustín Castro-Pinto Saltillo; LM-PS: Luis Moya-Pinto Saltillo; RC-PS: Ramón Corona-Pinto Saltillo; SCS-PS: Santa Catalina de Sena-Pinto Saltillo; CC-B: Calixto Contreras-Black; DD-B: Durango-Black; IA-B1: Ignacio Allende-Black 2016; IA-B2: Ignacio Allende-Black 2017).

in pressure cooked legumes compared to boiled legumes because it caused a more uniform and complete gelatinization.

Figure 1 shows the contents of soluble (SDF), insoluble (IDF) and total dietary fiber (TDF) in raw- and cooked-bean flours. The highest SDF content was found in the Pinto Saitillo variety, specifically in samples SCS-PS (raw) and AO-PS (cooked). The highest IDF content was found in the Black variety, specifically in samples IA-B2 and CC-B (raw and cooked, respectively), and the highest TDF content was found in the Black variety, in samples IA-B2 (raw) and CC-B (cooked).

Cooked samples had an SDF content of 4.7 to 8.9 %, which was higher than that of raw samples. Heat treatment induces structural disintegration and a high degree of fragmentation of the food matrix, which allows more water molecules to interact with other compounds through hydrogen bonds, improving compound solubility, water retention and swelling capacity (Chen *et al.*, 2014).

The IDF contents in raw- and cooked-samples were 35.7-51.0 % and 24.7-51.8 %, respectively, showing a tendency to decrease with heat processing except for the JAC-PS sample. IDF content represents around 93-97 % of the TDF content in legumes, and therefore, SDF represents a smaller proportion (3-7 %) of the dietary fiber content in beans. Therefore, if an increasing or decreasing trend is observed for the insoluble fraction, in general this trend will be observed in the TDF content in legumes (Martín-Cabrejas *et al.*, 2008). An appropriate heat pre-treatment can expand the fiber compact structure by transforming hemicellulose, resulting in an increase in porosity and a reduction of the mechanical strength of the polymer matrix, facilitating the decrease in the insoluble fiber content. In addition, heat treatment can cause changes in the physical characteristics and chemical composition of dietary fiber by inducing partial degradation of the insoluble fraction components (cellulose and hemicellulose) to simple carbohydrates (Ullah *et al.*, 2018). An increase in insoluble fiber content, as an effect of heat treatment, can be associated with protein-fiber complexes formed after a chemical modification induced by seed cooking (Bressani, 1993).

The high values of dietary fiber can be attributed to the different crop and growth conditions of the different samples. Kutoš *et al.* (2003) reported a higher dietary fiber content in cooked bean samples without prior soaking, as was done in this research, suggesting a higher nutritional value than for soaked and cooked beans. They also observed that changes in dietary fiber content due to thermal processing of beans are highly complex, and depend on the type of bean, type of processing and treatment duration. Campos-Vega *et al.* (2009) analyzed the soluble and insoluble fiber content of different varieties of Mexican beans (raw and cooked) and reported a higher content of both fibers in the cooked samples, with values of up to 14 % for SDF and 41 % for IDF.

Kutoš *et al.* (2003) and Londero *et al.* (2005) suggested that fiber contents may vary with the analytical method used, impeding proper comparison for values obtained with

different methods. Picolli and Ciocca (1999) reported that the most appropriate method is that which considers dietary fiber and quantifies the different fiber fractions (soluble and insoluble) using enzymes, generating results that are similar to those generated under physiological conditions in the gastrointestinal tract.

Functional properties

The physicochemical properties of foods with high starch and protein contents are important, particularly water absorption capacity (WAC), which is indicative of the ability of the macromolecule to interact with water, and the water absorption index (WAI), which depends on the availability of hydrophilic groups to bind with water molecules. The oil absorption capacity (OAC) is associated with the physical entrapment of the oil and with the accessibility to non-polar sites in the protein polypeptide chain; it is an indirect measurement of protein denaturation (Singh *et al.*, 2005). In general, the WAC, WAI and OAC values of cooked bean flours were higher than in raw samples. The WAC values (Table 3) for raw bean flours ranged from 1.0 to 2.4 mL/g, with significant differences between samples. The sample CC-PS showed the highest value. Heat treatment resulted in WAC values between 2.9 and 3.6 mL/g. Peyrano *et al.* (2016) have reported that heat treatment causes protein denaturation, increasing accessibility to the proteins polar amino acid groups, improving its affinity for water and increasing water absorption capacity. Thermal processing promotes gelatinization of starch (including amylose and amylopectin chains dissociation) and a high content of raw fiber that undergoes swelling, this structure modification exposes new binding sites that can interact with water molecules contributing to the increase in water absorption capacity (BeMiller and Huber, 2007).

WAI ranged from 1.5 to 2.1 g/g for raw samples and from 2.8 to 3.4 g/g for heat-treated samples. Water absorption is one of the most important parameters and WAI values of 2.6 to 3.7 g/g indicates that the bean is well cooked (Granito *et al.*, 2004). Oil absorption capacity ranged from 0.8 to 1.8 g/g for raw beans and from 1.3 to 2.0 g/g for heat-treated samples. These results are compatible with those reported by Rocha-Guzmán *et al.* (2008). The OAC is a product of the physical entrapment of fats by proteins, through the formation of micelles. Heat treatment can affect the composition and profile of polar and non-polar amino acids; the content of polar amino acids decreases after thermal processing while the content of non-polar amino acids increases. A higher proportion of non-polar groups on the surface of the protein could be responsible for an enhanced OAC (Lin and Fernández-Fraguas, 2020).

The high WAC values can be attributed to the hydrophilic nature of proteins, and high OAC values are related to a greater availability of non-polar side chains in the molecules. A WAC value greater than 90 % can be considered adequate to obtain cooking times of less than 110 min (Pérez-Herrera *et al.*, 2002).

Tabla 3. Capacidad de absorción de agua, índice de absorción de agua y capacidad de absorción de aceite en harinas de frijol crudo y cocido de las variedades Pinto Saltillo y Negro.
Table 3. Water absorption capacity, water absorption index and oil absorption capacities of raw and cooked beans flours of the Pinto Saltillo and Black beans varieties.

Sample	WAC (ml/g)		WAI (g/g)		OAC (g/g)	
	Raw	Cooked	Raw	Cooked	Raw	Cooked
AO-PS	1.09 ± 0.14 ^{Bd}	2.96 ± 0.11 ^{Aa}	1.65 ± 0.02 ^{Ba}	3.23 ± 0.01 ^{Aabc}	0.96 ± 0.02 ^{Aab}	1.55 ± 0.20 ^{Abc}
CC-PS	2.39 ± 0.01 ^{Ba}	2.95 ± 0.11 ^{Aa}	2.04 ± 0.45 ^{Ba}	3.18 ± 0.04 ^{Aabc}	0.88 ± 0.03 ^{Bb}	1.30 ± 0.06 ^{Ac}
DCV-PS	1.29 ± 0.14 ^{Bcd}	3.35 ± 0.00 ^{Aa}	1.45 ± 0.22 ^{Ba}	3.23 ± 0.06 ^{Aabc}	0.81 ± 0.05 ^{Bb}	1.49 ± 0.16 ^{Abc}
EP-PS	1.29 ± 0.42 ^{Bcd}	2.87 ± 0.22 ^{Aa}	1.57 ± 0.23 ^{Ba}	3.08 ± 0.05 ^{Aabc}	0.91 ± 0.08 ^{Bb}	1.58 ± 0.03 ^{Abc}
IR-PS	1.59 ± 0.00 ^{Bbcd}	3.20 ± 0.22 ^{Aa}	1.68 ± 0.03 ^{Ba}	3.14 ± 0.05 ^{Aab}	0.84 ± 0.02 ^{Bb}	1.84 ± 0.10 ^{Ab}
JAC-PS	1.55 ± 0.05 ^{Bbcd}	3.03 ± 0.00 ^{Aa}	1.83 ± 0.22 ^{Ba}	3.28 ± 0.06 ^{Aab}	1.17 ± 0.02 ^{Ba}	1.56 ± 0.06 ^{Abc}
LM-PS	1.99 ± 0.00 ^{Bab}	3.20 ± 0.22 ^{Aa}	1.91 ± 0.23 ^{Ba}	3.18 ± 0.05 ^{Aabc}	1.02 ± 0.00 ^{Bab}	1.64 ± 0.05 ^{Aabc}
RC-PS	1.59 ± 0.00 ^{Bbcd}	3.03 ± 0.00 ^{Aa}	1.71 ± 0.09 ^{Ba}	3.42 ± 0.05 ^{Aa}	0.98 ± 0.03 ^{Bab}	1.72 ± 0.13 ^{Ab}
SCS-PS	1.59 ± 0.00 ^{Bbcd}	3.35 ± 0.00 ^{Aa}	1.54 ± 0.49 ^{Ba}	3.16 ± 0.06 ^{Aab}	0.93 ± 0.02 ^{Bb}	1.62 ± 0.09 ^{Aabc}
CC-B	1.19 ± 0.28 ^{Bcd}	3.60 ± 0.56 ^{Aa}	1.79 ± 0.32 ^{Ba}	3.02 ± 0.08 ^{Abc}	1.03 ± 0.08 ^{Bab}	1.87 ± 0.05 ^{Ab}
DD-B	1.60 ± 0.00 ^{Bbcd}	2.95 ± 0.33 ^{Aa}	2.08 ± 0.01 ^{Ba}	3.07 ± 0.02 ^{Aabc}	0.95 ± 0.03 ^{Bab}	1.75 ± 0.07 ^{Ab}
IA-B1	1.79 ± 0.00 ^{Bbc}	3.28 ± 0.11 ^{Aa}	1.91 ± 0.09 ^{Ba}	3.14 ± 0.09 ^{Aabc}	0.88 ± 0.00 ^{Bb}	1.98 ± 0.02 ^{Aa}
IA-B2	1.79 ± 0.00 ^{Bbc}	2.95 ± 0.11 ^{Aa}	2.13 ± 0.06 ^{Ba}	2.84 ± 0.05 ^{Aabc}	0.99 ± 0.04 ^{Bab}	1.84 ± 0.03 ^{Ab}

Data represent the mean ± standard deviation. Data connected by different capital letters in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments (raw and cooked). Different lowercase letters in the same column indicate statistical differences ($p < 0.05$) between varieties. Analyzes performed in triplicate. (AO-PS: Alvaro Obregón-Pinto Saltillo; CC-PS: Calixto Contreras-Pinto Saltillo; DCV-PS: Dr. Castillo del Valle-Pinto Saltillo; EP-PS: Estación Progreso-Pinto Saltillo; IR-PS: Ignacio Ramírez-Pinto Saltillo; JAC-PS: Jesús Agustín Castro-Pinto Saltillo; LM-PS: Luis Moya-Pinto Saltillo; RC-PS: Ramón Corona-Pinto Saltillo; SCS-PS: Santa Catalina de Sena-Pinto Saltillo; CC-B: Calixto Contreras-Black; DD-B: Durango-Black; IA-B1: Ignacio Allende-Black 2016; IA-B2: Ignacio Allende-Black 2017).

CONCLUSIONS

Cooking process improved the nutritional and functional properties of common bean. Common beans from Pinto Saltillo and black varieties from the State of Durango, Mexico are a good source of nutrients such as protein, starch and fiber. Water and oil absorption capacity in flour from cooked beans were higher compared to flour from raw beans. The knowledge of the chemical and functional characteristics of the beans studied, gives important information that can be useful for their commercialization in the case of raw beans and the quality of them after being thermally processed.

ACKNOWLEDGEMENTS

Author Melissa del Carmen Soto-Quiñones thanks the scholarship given by the National Council of Science and Technology (CONACYT) to carry out doctoral studies in Biochemical Engineering at the Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Durango.

BIBLIOGRAPHY

- A.O.A.C. 2005. Association Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Vol. 1. 18th. Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- Ávila, M.M.R., González, R.H., Rosales, S.R., Zandate, H.R., Pajarito, R.A. and Espinoza, A.D.J. 2009. Diagnóstico y adopción de la variedad de frijol Pinto Saltillo en la región temporalera del norte centro de México. INIFAP-CIRNOC-Campo

- Experimental Sierra de Chihuahua. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua. México. Folleto científico. (12): 48.
- BeMiller, J. N. and Huber, K. C. 2007. Carbohydrates. In Fennema's Food Chemistry Damodaran, S., Parkin, K.L., and Fennema, O.R. (ed), pp. 83–151 4th ed. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL.
- Bressani, R. 1993. Grain quality of common beans. Food Reviews International. Taylor & Francis Group. 9(2): 237-297.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J.A., Guzman-Maldonado, S.H., Paredes-Lopez, O., Oomah, B.D., and Loarca-Piña, G. 2009. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Food Science. 74(7): T59-T65.
- Castro-Rosas, J., Aguirre-Santos, E.A., Gómez-Aldapa, C.A., Valle-Cervantes, S., Ochoa-Martínez. L.A., Hernandez-Santos, B. and Rodríguez-Miranda, J. 2016. Effect of harvest year on the physical properties, chemical composition and cooking time of three common bean varieties that are grown in Mexico. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods. 8(3): 339-348.
- Chen, Y., Ye, R., Yin, L., and Zhang, N. 2014. Novel blasting extrusion processing improved the physicochemical properties of soluble dietary fiber from soybean residue and in vivo evaluation. Journal of Food Engineering. 120: 1-8.
- Corzo-Ríos, L.J., Sanchez-Chino, X.M., Cardador-Martínez, A., Martínez-Herrera, J., Jiménez-Martínez, C. 2020. Effect of cooking on nutritional and non-nutritional compounds in two species of *Phaseolus* (*P. vulgaris* and *P. coccineus*) cultivated in Mexico. International Journal of Gastronomy and Food Science. 20: 100206.

- Du, S.K., Jiang, H., Ai, Y. and Jane, J.L. 2014. Physicochemical properties and digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starches. *Carbohydrate Polymers*. 108(1): 200-205.
- Fabbri, A.D.T., Schacht, R.W. and Crosby, G.A. 2016. Evaluation of resistant starch content of cooked black beans, pinto beans, and chickpeas. *NFS Journal*. 3: 8-12.
- Fernández-Valenciano, A.F. and Sánchez-Chávez, E. 2017. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México. *Nova scientia*. 9(18): 133-148.
- García-Alonso, A., Goñi, I. and Saura-Calixto, F. 1998. Resistant starch and potential glycaemic index of raw and cooked legumes (lentils, chickpeas and beans). *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. 206(4): 284-287.
- Granito, M., Guerra, M., Torres, A., and Guinand, J. 2004. Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna Sinensis*; *Interciencia*. 29(9): 521-526.
- Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Cui, S.W., Li, Y., Xu, S., Wu, Y., Wang, J., Bai, Z., Xie, M. 2017. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 108: 467-477.
- Kutoš, T., Golob, T., Kač, M. and Plestenjak, A. 2003. Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chemistry*. 80(2): 231-235.
- Lin, T. and Fernández-Fraguas, C. 2020. Effect of thermal and high-pressure processing on the thermo-rheological and functional properties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT*. 127: 109325
- Londero, P.M.G., Ribeiro, N.D., de Abreu Rodrigues, J., Poersch, N.L., and Trentin, M. 2005. Genetic variability for dietary fiber content in common bean populations. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 5: 86-90.
- Martín-Cabrejas, M.A., Díaz, M. F., Aguilera, Y., Benítez, V., Mollá, E., and Esteban, R.M. 2008. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chemistry*. 107(3): 1045-1052.
- Naozuka, J., and Oliveira, P. V. (2012). Cooking effects on iron and proteins content of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by GF AAS and MALDI-TOF MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 23: 156-162.
- NMX-F-428-1982, Norma Mexicana. 1982. Alimentos. Determinación de humedad (Método rápido de la termobalanza). *Foods*. Determination of moisture (Thermobalance rapid method). NMX-F-428-1982. Dirección General de Normas. Octubre 7, 1982
- Palacio-Márquez, A., Ojeda-Barríos, D., Jimenez-Castro, J., Preciado-Rangel, P., Hernandez-Rodriguez, O.A., and Sanchez, E. 2021. Biofortification potential in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): bioactive compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of 155 varieties grown in Mexico. *Noyulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 49(1): 12123-1.2123.
- Pérez-Herrera, P., Esquivel Esquivel, G., Rosales Serna, R., and Acosta-Gallegos, J.A. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52(2): 172-180.
- Peyrano, F., Speroni, F. and Avanza, M.V. 2016. Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 33: 38-46.
- Picolli, L. and Ciocca, M.L.S. 1999. Métodos para avaliação de fibra alimentar. In *Tópicos em produção animal*. Ribeiro, Aml; Bernardi, Ml; Kessler, Am. pp. 307-322. Porto Alegre: UFRGS.
- Ramírez-Cárdenasi, L., Leonel, A.J., and Costa, N.M.B. 2008. Effect of domestic processing on nutrient and antinutritional factor content in different cultivars of common beans. *Food Science and Technology*. 28(1): 200-213.
- Rebello, C., Green, F.L. and Finley, J.W. 2014. A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related comorbidities. *Obesity reviews*. 15(5): 392-407.
- Rocha-Guzman, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Gonzalez-Laredo, R.F., Bello-Perez, A., Delgado-Licon, E., Ochoa-Martinez, A., and Prado-Ortiz, M.J. 2008. Physical Properties of extruded products from Three Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*. 63(3): 99-104.
- Rosales, S.R., Acosta, G.J.A., Ibarra, P.F.J., Cuéllar, R.E.I. and Nava, B.C.A. 2009. Validación de líneas y variedades mejoradas de frijol en Durango. INIFAP-Campo Experimental Valle de Guadiana. Durango, Durango. México, DF Publicación especial. (36):84.
- Rosales-Serna, R., Flores-Gallardo, H., Nava-Berumen, C.A., and Ortiz-Sánchez, I.A. 2019. Rendimiento y calidad de grano en líneas mejoradas de frijol cultivadas bajo riego en Durango, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 42(1): 39-46.
- Rosales S.R., Flores, G.H., and S. Santana, E.H. 2020a. NOD 1, variedad mejorada de frijol negro opaco para el estado de Durango. INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Valle del Guadiana. Durango, Dgo., México. 28
- Rosales S.R., Flores, G.H., and S. Santana, E.H. 2020b. PID 1, variedad mejorada de frijol pinto para el estado de Durango. INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Valle del Guadiana. Durango, Dgo., México. 27
- Sánchez-Velázquez, O.A., Ribéreau, S., Mondor, M., Cuevas-Rodríguez, E.O., Arcand, Y. and Hernández-Álvarez, A.J. 2021. Impact or processing on the in vitro protein quality, bioactive compounds, and antioxidant potential of 10 selected pulses. *Legume Science*. 3(2): 88.
- Senthilkumar, T., Jian, F., Jayas, D.S., and Narendran, R.B. 2018. Physical properties of White and Black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Applied Engineering in Agriculture*. 34(4): 749-754.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. *Panorama Agroalimentario 2020*. pp. 76 - 77. SIAP
- Singh, B., Singh, J.P., Shevkano, K., Singh, N., and Kaur, A. 2016. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*. 54(4): 858-870.
- Singh, N., Kaur, M. and Sandhu, K. 2005. Physicochemical and Functional Properties of Freeze-Dried and Oven Dried Corn Gluten Meals. *Drying Technology*. 23(4): 975-988.
- Ullah, I., Yin, T., Xiong, S., Huang, Q., Zhang, J., and Javid, A.B. 2018. Effects of thermal pre-treatment on physicochemical properties of nanosized okara (soybean residue) insoluble dietary fiber prepared by wet media milling. *Journal of Food Engineering*. 237: 18-26.
- Wainaina, I., Wafula, E., Sila, D., Kyomugasho, C., Grauwet, T., Van Loey, A., and Hendrickx, M. 2021. Thermal treatment of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Factors determining cooking time and its consequences for sensory and nutritional quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 20(4): 3690-3718.
- Wang, N., Hatcher, D.W., Tyler, R.T., Toews, R., and Gawalko, E.J. 2010. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*. 43(2): 589-594.
- Yadav, B. S., Sharma, A. and Yadav, R. B. 2010. Resistant starch content of conventionally boiled and pressure-cooked cereals, legumes and tubers. *Journal of Food Science and Technology*. 47(1): 84-88.



Caracterización fisicoquímica, actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales de nopal morado (*Opuntia gosseliniana*) en dos etapas de coloración

Physicochemical characterization, antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of purple prickly pear (*Opuntia gosseliniana*) at two stages of coloration

Manzanarez-Tenorio LE¹, Ruiz-Cruz S^{2*}, Cira-Chávez LA¹, Estrada-Alvarado MI¹, Márquez-Ríos E², Del-Toro-Sánchez CL², Suárez-Jiménez GM²

¹ Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. 5 de febrero 818 Sur, C.P. 85000, Cd. Obregón, Sonora, México.

² Universidad de Sonora, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Rosales y Niños Héroes 14 S/N, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

El nopal (*Opuntia gosseliniana*) es considerado un producto alimenticio de interés debido a sus propiedades funcionales, incluyendo su actividad antioxidante. El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades físico-químicas (color, pH y sólidos solubles totales), actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP), contenido de fenoles y flavonoides totales y contenido de betalainas. Así como la evaluación de la toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos etanólicos de nopal en dos etapas de coloración: verde y morado. El color fue característico para cada etapa de coloración. No se observaron diferencias significativas en los valores de pH y SST en cada etapa de coloración. El % de humedad fue mayor en nopal verde (81 %) con respecto al nopal morado (76.65 %). Respecto al grado de toxicidad, los extractos de nopal morado presentaron menor toxicidad que los extractos de nopal verde. Los valores más altos para fenoles y flavonoides totales se encontraron en las muestras de color morado, con valores de 2.31 mg EAG/gps y 3.06 mg EQ/gps, respectivamente. De igual manera, en la actividad antioxidante se obtuvieron valores más altos en la etapa de color morado en las tres técnicas utilizadas. Por lo que, esta especie de cactácea podría ser una fuente potencial de antioxidantes y pigmentos de interés agroindustrial.

Palabras clave: Antioxidantes, ABTS, DPPH, fenoles totales, betalainas.

ABSTRACT

Nopal (*Opuntia gosseliniana*) is considered a food product of interest due to its functional properties, including its antioxidant activity. The objective of this work was to evaluate the physical-chemical properties (color, pH and total soluble solids), antioxidant activity (DPPH, ABTS and FRAP), content of total phenols and flavonoids, and betalain content. As well as the evaluation of the toxicity of ethanolic extracts of nopal at two stages of coloration: green and purple. Color was characteristic for each coloration stage. No significant differences were observed in pH and SST values at each coloration stage. The % moisture was higher in green

nopal (81 %) compared to purple nopal (76.65 %). Regarding the degree of toxicity, purple nopal extracts showed less toxicity than green nopal extracts. The highest values for total phenols and flavonoids were found in purple samples, with values of 2.31 mg EAG/gps and 3.06 mg EQ/gps, respectively. Similarly, in the antioxidant activity (in the three techniques used) and betalain content, higher values were obtained at the purple color stage. Therefore, this species of cacti could be a potential source of antioxidants and pigments of agro-industrial interest.

Keywords: Antioxidants, ABTS, DPPH, total phenols, betalains.

INTRODUCCIÓN

México constituye uno de los centros de diversidad más importantes de cactáceas y en él se alcanza la más alta diversidad a nivel continental (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010). El género *Opuntia* pertenece a la familia *Cactaceae*, subfamilia *Opuntioideae*. Este género presenta una alta capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas (alta temperatura, sequía, radiación UV) y se distribuye en regiones áridas y semiáridas (Astello-García *et al.*, 2015). Algunos estudios han demostrado que diversas fuentes de origen vegetal contienen muchos compuestos con actividad antioxidante, los cuales juegan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas y el estrés oxidativo, teniendo la capacidad de inhibir los procesos de oxidación, así como evitar el envejecimiento de los tejidos. Además, se ha dirigido gran atención hacia el desarrollo de medicamentos de origen vegetal, precisando las investigaciones acerca de plantas con alto poder antioxidante y baja toxicidad. Varias plantas han sido estudiadas como fuentes de antioxidantes naturales potenciales en la industria alimentaria (Moure *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2014).

Debido a la tendencia global hacia el uso de fitoquímicos naturales con potencial antioxidante, el género *Opuntia* parece ser una buena fuente de esos compuestos (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010). La especie más estudiada ha sido la *Opuntia ficus-indica*, siendo la especie más comercial,

*Autor para correspondencia: Saul Ruiz Cruz
 Correo electrónico: saul.ruizcruz@unison.mx

Recibido: 26 de enero de 2022

Aceptado: 17 de junio de 2022

sin embargo, existen otras especies silvestres que podrían también presentar en su composición sustancias bioactivas que coadyuven a la salud del consumidor, ya que se ha comprobado que el género *Opuntia* presenta un alto contenido de compuestos fenólicos que lo hacen de interés para los consumidores (Cardador-Martínez, 2011).

Opuntia gosseliniana es una especie silvestre de nopal, el cual ha sido de interés para este trabajo debido al color morado de sus pencas, el cual es conferido a las betalainas, un pigmento que se concentra en floraciones y frutos de plantas propias de la familia *Caryophyllaceae* (Khatabi *et al.*, 2016). En este trabajo, se realizó la caracterización físico-química, actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de extractos de *O. gosseliniana* en dos etapas de coloración, verde y morado. Además, se realizó un ensayo de letalidad sobre *Artemia salina* de los extractos de nopal, con el fin de conocer el grado de toxicidad de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal (*O. gosseliniana*) fue recolectado en la localidad de Buena Vista, Sonora y trasladado en bolsas ziploc a temperatura ambiente al laboratorio de Tecnologías Emergentes del Centro de Investigación e Innovación Biotecnológica, Agropecuaria y Ambiental (CIIBAA) en ITSON Unidad Centro de la localidad de Ciudad Obregón, Sonora.

Caracterización fisicoquímica

Color, pH, Sólidos solubles totales (SST) y humedad

El color de las pencas de nopal se determinó de acuerdo con el sistema CIELAB, utilizando un espectrofotómetro de Esfera (Serie SP60, Michigan, USA), preparando previamente una masa homogénea de 10 pencas. Con los valores obtenidos de L^* , a^* y b^* , se calcularon los valores de °Hue (Tono) y C^* (Croma). Para la medición del pH, se determinó en forma directa en la mezcla obtenida en la medición del color con un potenciómetro (STARTER 3100, OHAUS, Parsippany, NJ, USA). Los sólidos solubles totales (SST) se determinaron colocando de forma directa una gota de muestra homogeneizada en un refractómetro digital (ATAGO Hand held pocket refractometer PAL-1 No. 3810). Los resultados se expresaron en °Brix y fueron el promedio de 10 repeticiones de la mezcla realizada para el color. Para la determinación de humedad, las muestras fueron puestas en un horno durante 18 h, tiempo en el cual se obtuvo un peso constante de las mismas, a una temperatura de secado que fue de $70\text{ }^\circ\text{C} \pm 5$. El porcentaje de humedad se obtuvo de acuerdo con la diferencia del peso inicial (10 g) y el peso final de la muestra, como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\frac{(P_o - P_f)}{P_{muestra}} \times 100 = \% H$$

$$\times 100 = \% H$$

Donde: P_o = Peso inicial; P_f = Peso final; $P_{muestra}$ = Peso total de la muestra; H = Humedad

Preparación de extractos

Se formó una masa homogénea al moler 10 pencas de nopal de cada coloración en una licuadora doméstica (proctox-silec, modelo 50171). Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas en un liofilizador (FreeZone6, LABCONCO) por 3 días. Una vez secas, fueron pulverizadas en una licuadora hasta obtener un polvo fino. Se tomó una parte de la muestra (relación 1:10 p/v) y se mezcló en vortex durante 4 min con la solución extractora (etanol 80 %), seguido de una sonicación por 15 min, para posteriormente centrifugarse por 20 min a 11,500 g. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se filtró al vacío con papel Whatman No. 2. Los extractos fueron almacenados en recipientes de plástico y refrigerados previos a la realización de los análisis correspondientes.

Evaluación de la capacidad antioxidante

Inhibición del radical DPPH

La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó mediante la técnica de inhibición del radical DPPH de acuerdo a Moein y Moein, (2010), con algunas modificaciones. El radical se preparó al mezclar 0.0025 g en metanol 80 %, dicho radical se ajustó a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 490 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Go, Vantaa, Finland). Posteriormente, se mezclaron 295 μL del radical DPPH y 5 μL del extracto, y se llevó a reposo por 30 min en completa oscuridad, finalmente se leyó la absorbancia a 490 nm. La actividad antioxidante se calculó con el uso de una curva estándar de Trolox y los resultados fueron expresados en μmol equivalente Trolox por gramo de peso seco ($\mu\text{mol ET/gps}$).

Inhibición del radical ABTS

La evaluación de la capacidad antioxidante mediante la inhibición del radical ABTS, se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones. El radical ABTS se preparó al mezclar 19 mg en 15 mL de agua destilada y a su vez se preparó una solución de persulfato de potasio, el cual se añadió al radical y se dejó reposar de 12 - 16 h. De esta solución incubada se tomaron 500 μL y se diluyó en 30 mL de etanol, ajustando la absorbancia a 0.7 ± 0.02 a 750 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Go, Vantaa, Finland). Una vez ajustado el radical, se tomaron 295 μL y 5 μL del extracto y la reacción se dejó reposar por 7 min, y finalmente se leyó la absorbancia a 750 nm. La actividad antioxidante se calculó con el uso de una curva estándar de Trolox y los resultados fueron expresados en μmol equivalente Trolox por gramo de peso seco ($\mu\text{mol ET/gps}$).

Ensayo del poder antioxidante reductor de hierro (FRAP)

El poder antioxidante reductor de hierro se determinó utilizando la metodología de Perez-Perez *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Se preparó la solución FRAP a partir de 3 soluciones: acetato de sodio (pH 3.6), FeCl_3 , TPTZ y se disolvieron a una relación de 10:1:1, respectivamente. Posteriormente se tomaron 280 μL del radical y 20 μL del extracto,

se dejó reposar durante 30 min y se leyó la absorbancia a 638 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Go, Vantaa, Finland). Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol eq. Trolox}$ por gramo de peso seco ($\mu\text{mol ET/gps}$).

Evaluación del contenido de fenoles y flavonoides totales

El contenido de *fenoles totales* se cuantificó mediante el método descrito por Silva-Beltrán *et al.* (2017), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en mezclar 150 μL de reactivo Folin-Ciocalteu con 30 μL de extracto y 120 μL de Na_2CO_3 . Se dejó reposar por 20 min en completa oscuridad y se leyó la absorbancia a 750 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Go, Vantaa, Finland). La concentración de fenoles totales se calculó utilizando una curva estándar de ácido gálico expresando los resultados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/gps).

La determinación del contenido de *flavonoides totales* se realizó mediante la técnica descrito por Silva-Beltrán *et al.* (2017), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 100 μL del extracto y 430 μL de la mezcla A de NaNO al 5 %, los cuales se incubaron por 5 min, posteriormente se agregaron 30 μL de AlCl_3 (10 %) y se dejó reposar 1 min para luego agregar 440 μL de la mezcla B (NaOH 1 mol/L). Posteriormente se tomó lectura a 490 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific Multiskan Go, Vantaa, Finland). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de quercetina por gramo de peso seco (mg EQ/gps).

Determinación de betalaínas

La determinación de betalaínas se realizó mediante la técnica descrita por Robles *et al.* (2018), con algunas modificaciones. Se realizaron extractos acuosos (relación 1:10) y se precedió al método de extracción descrito en la sección de preparación de extractos. Una vez obtenidos los extractos, se tomó lectura, y las concentraciones de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$B \text{ (mg/g)} = (A * FD * PM * V) / (\epsilon * L * P)$$

Donde: A: Absorbancia medida a 535 nm para betacianina y 487 para betaxantina; FD: Factor de dilución al momento de leer; PM: Peso molecular para betacianina (betanina 550 g/mol e indicaxantina 308 g/mol); V: Volumen del extracto; ϵ : Coeficiente extinción molar (Betanina= 60,000 L/mol.cm e indicaxantina = 48,000 L/mol.cm); L: Longitud celda (1 cm). Los resultados se expresaron como mg por gramo de peso seco para las concentraciones de betacianinas (mg BC/gps) y betaxantinas (mg BX/gps).

Evaluación de la toxicidad de los extractos de *O. gosseliniana* sobre *Artemia salina*

La evaluación de la toxicidad de los extractos se realizó mediante la técnica de letalidad sobre *A. salina* de acuerdo al método descrito por Molina-Salinas (2006), con

algunas modificaciones. Para la eclosión de los huevecillos, se colocaron 0.01 g de *A. salina* en agua de mar artificial (40 g de sal/L de agua destilada) incubados por 48 h. Una vez pasado el tiempo de incubación, se colocaron en una microplaca 10 nauplios vivos (TV) en contacto con 150 μL del extracto y 120 μL de agua de mar, y se llevó nuevamente en incubación por 24 h. Posteriormente, se realizó el conteo de nauplios muertos (TM) utilizando un estereoscopio. El porcentaje de letalidad se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación: $\% \text{ Letalidad} = \text{TM}/\text{TV} * 100$, calculando la CL50 de acuerdo con el análisis PROBIT, el cual se realizó utilizando el programa SPSS versión 25. El grado de toxicidad se determinó de acuerdo con la siguiente clasificación (Tabla 1).

Análisis estadístico

Tabla 1. Clasificación de toxicidad.

Table 1. Toxicity classification.

Grado de toxicidad	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
I Extremadamente tóxico	1-10
II Altamente tóxico	10-100
III Moderadamente tóxico	100-500
IV Ligeramente tóxico	500-1000
V Prácticamente no tóxico	1000-1500
VI Relativamente inocuo	> 1500

Fuente: Sánchez & Neira (2005).

Cada uno de los análisis se realizó a través de un experimento independiente. El diseño estadístico fue completamente al azar por triplicado. Para el análisis de los distintos tratamientos se asumió ($p \leq 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico StatGraphics versión 5.1.

(The Plains, Virginia, E.U.). Además, se obtuvo el coeficiente de correlación (r) para determinar la relación del contenido de fenoles, flavonoides y betalaínas sobre los ensayos de actividad antioxidante realizados en los extractos de *O. gosseliniana*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica

Respecto al color del fruto, la luminosidad medida a través del parámetro L^* fue de 35.94 ± 1.21 y 42.74 ± 0.70 para nopal morado y verde, respectivamente (Tabla 2). Para los valores de a^* que van de verde (negativo) a rojo (positivo), se muestra una tendencia esperada de acuerdo con las etapas de coloración en ambas muestras, con resultados de -5.69 ± 0.35 y 0.63 ± 0.32 para la etapa verde y morada, respectivamente. Para los valores de b^* que van de azul (negativo) a amarillo (positivo), el valor más alto obtuvo en la muestra de nopal verde con 22.03 ± 1.23 , seguido de 14.46 ± 0.31 para la etapa morada. Los valores obtenidos en Hue y Cromo, muestran valores superiores en las muestras en etapa de color verde, siendo la tonalidad e intensidad del color superior en las muestras de dicha etapa de coloración. Las muestras en etapa de maduración morado presentaron valores mayores en pH y SST (4.29 ± 0.01 y 11.33 ± 0.15 ,

Tabla 2. Caracterización físico-química de extractos de nopal morado en dos etapas de coloración.**Table 2.** Physico-chemical characterization of purple prickly pear at two stages of coloration.

	Nopal morado	Nopal verde
Color		
L*	35.94 ± 1.21 ^a	42.74 ± 0.70 ^b
a*	0.63 ± 0.32 ^a	-5.69 ± 0.35 ^b
b*	14.46 ± 0.31 ^a	22.03 ± 1.23 ^b
h*	87.50 ± 1.31 ^a	104.49 ± 0.49 ^b
C*	14.48 ± 0.30 ^a	22.76 ± 1.27 ^b
pH	4.29 ± 0.01 ^b	4.22 ± 0.02 ^a
SST	11.33 ± 0.15 ^a	11.00 ± 0.20 ^a
Humedad	76.65 ± 0.99 ^a	81.00 ± 0.41 ^b

Los resultados para color se expresaron de acuerdo a la escala CIE L*a*b*, SST se expresaron como °Brix, humedad como porcentaje. Letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

respectivamente) con respecto al nopal verde con valores de 4.22 ± 0.02 y 11 ± 0.20 en pH y SST, respectivamente. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre ambas etapas de coloración en dichos parámetros de pH y SST. El porcentaje de humedad fue superior en la etapa de color verde, con un valor de 81.00 ± 0.41 %, mientras que, en la etapa de color morada, el porcentaje fue de 76.65 ± 0.99 , presentando diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre ambas etapas de maduración. Estos valores de humedad son menores a los reportados por Maki-Díaz *et al.* (2015) en nopal verde.

Evaluación del contenido de fenoles, flavonoides y betalainas

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación del contenido de fenoles totales de los extractos de nopal en dos etapas de coloración. El nopal morado presentó el valor más alto con 2.31 ± 0.05 mg EAG/gps, mostrando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en comparación con la etapa verde, el cual presentó un valor de 2.08 ± 0.03 mg EAG/gps. Benayad *et al.* (2014) reportaron valores similares a los obtenidos en este trabajo para el contenido de fenoles totales en extractos metanólicos de flores de *Opuntia ficus* (2.34 y 2.40 mg EAG/gps). Un comportamiento similar se observó en el contenido de flavonoides, donde el nopal en la etapa de coloración morada presentó el valor más alto con respecto al color verde (3.06 ± 0.11 y 2.42 ± 0.01 mg EQ/gps, respectivamente). Se ha reportado que los compuestos fenólicos ayudan a proteger la planta contra la luz ultravioleta y actúan como defensas contra microorganismos patógenos en las plantas (Osorio-Esquivel *et al.*, 2011). Los resultados en el contenido de betalainas, demuestran la presencia de dicho pigmento solo en la etapa de color morada, obteniendo valores de 0.016 ± 0.00 y 0.006 ± 0.00 mg/g para betacianina y betaxantina, respectivamente, siendo los resultados acordes con el color de la muestra. Sin embargo, los resultados obtenidos son inferiores a los presentados por Aguilar *et al.* (2018), quienes obtuvieron valores de 2.56 - 7.67 y 0.76 - 4.24 mg/g para betacianina y betaxantina, respectivamente.

Tabla 3. Contenido de fenoles y flavonoides totales y betalainas en nopal en dos etapas de coloración.**Table 3.** Content of total phenols and flavonoids and betalains in prickly pear at two stages of coloration.

	Nopal morado	Nopal verde
Fenoles Totales	2.31 ± 0.05^a	2.08 ± 0.03^b
Flavonoides Totales	3.06 ± 0.11^a	2.42 ± 0.01^b
Betalainas		
Betacianina	0.016 ± 0.000	N/P
Betaxantina	0.006 ± 0.000	

Los resultados de fenoles y flavonoides totales se expresan como mg EAG/gps y EQ/gps respectivamente; los valores para betalainas se expresan como mg/g. Letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Dichos autores utilizaron un proceso de extracción más prolongado en comparación con el presente estudio, siendo este tratamiento una causa probable de la poca liberación del pigmento obtenido. Ramírez-Ramos *et al.* (2015) reportaron mayor contenido de fenoles, flavonoides y betalainas en frutos de diferentes variedades de *Opuntia* en estado de madurez morado, con respecto a los verdes u otros estados de maduración, similar a los resultados encontrados en el presente estudio, donde los valores más altos obtenidos fueron en el nopal morado con respecto al verde.

Evaluación de la capacidad antioxidante

Los valores más altos para la capacidad antioxidante se encontraron en el extracto de nopal morado, con valores de 20.13 ± 0.15 , 9.17 ± 0.28 y 17.22 ± 0.20 $\mu\text{mol ET/gps}$ para DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente (Tabla 4). Dichos valores fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) con respecto a los valores obtenidos en nopal verde, el cual presentó valores de 17.75 ± 0.04 , 7.75 ± 0.08 y 13.38 ± 0.09 $\mu\text{mol ET/gps}$ para DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Bayar *et al.* (2016), reportaron valores superiores al evaluar extractos de mucilago de *Opuntia ficus indica*, considerándolo una buena fuente de antioxidantes naturales.

Evaluación de la toxicidad de los extractos de *O. gosseliana* sobre *Artemia salina*

La evaluación de la toxicidad de extractos vegetales es indispensable con el objetivo de considerar un tratamiento seguro, permite la definición de la toxicidad intrínseca de la planta y los efectos de una sobredosis aguda (Ramos *et al.*,

Tabla 4. Actividad antioxidante de nopal morado en dos etapas de coloración.**Table 4.** Antioxidant activity of purple prickly pear at two stages of coloration.

	Nopal morado	Nopal verde
DPPH	20.13 ± 0.15^a	17.75 ± 0.04^b
ABTS	9.17 ± 0.28^a	7.75 ± 0.08^b
FRAP	17.22 ± 0.20^a	13.38 ± 0.09^b

*Los resultados de DPPH, ABTS y FRAP se expresan como $\mu\text{M ET/gps}$. Letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

2012). El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio (Fernández *et al.*, 2009). Por ser un ensayo simple, eficiente, rápido y de bajo costo ha sido utilizado como una pre-evaluación de los extractos y sustancias con potencial farmacológico (Martins *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos para la prueba de toxicidad sobre *A. salina* se observan en la Tabla 5. De acuerdo con la tabla de clasificación (Tabla 1) los extractos de nopal morado presentaron un CL50 de 758.58 µg/mL, obteniendo un grado de toxicidad de ligeramente tóxico, mientras que para los extractos de nopal verde el CL50 fue de 331.13 µg/mL, con un grado de toxicidad de moderadamente tóxico.

Tabla 5. Evaluación del grado de toxicidad de nopal morado en dos etapas de coloración sobre *Artemia salina*.

Table 5. Evaluation of the degree toxicity of purple prickly pear at two stages of coloration on *Artemia salina*.

Muestra	CL50	Nivel	Grado de toxicidad
Nopal morado	758.58 µg/mL	IV	Ligeramente tóxico
Nopal verde	331.13 µg/mL	III	Moderadamente tóxico

Coefficiente de correlación de los extractos de *O. gosseliniana*

En la Tabla 6 se muestra el coeficiente de correlación para los extractos de *Opuntia gosseliniana* en dos etapas de coloración. La realización de dicho análisis permite conocer la relación entre las evaluaciones de capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP), compuestos fenólicos, flavonoides y betalainas. De acuerdo con los resultados obtenidos, en los extractos de nopal verde se observó una correlación positiva entre la capacidad antioxidante por ABTS y los compuestos fenólicos ($r=0.437$). Sin embargo, se observó una correlación negativa entre la capacidad antioxidante por DPPH y los compuestos fenólicos. Esos resultados podrían deberse al establecimiento de relaciones antagonicas entre las diferentes clases de flavonoides o con otros metabolitos presentes en los extractos (Ramos *et al.*, 2012).

Para los resultados obtenidos en los extractos de nopal morado, los compuestos fenólicos mostraron una correlación positiva con la actividad antioxidante de DPPH ($r=0.999, p<0.05$) y FRAP ($r=0.984$). En el caso de los flavonoides,

Tabla 6. Coeficiente de correlación (r) entre la capacidad antioxidante y los compuestos de fenoles, flavonoides y betalainas de extractos de nopal morado en dos estados de coloración.

Table 6. Correlation coefficient (r) between antioxidant capacity and the compounds of phenols, flavonoids and betalains from purple prickly pear extracts at two stages of coloration.

	Nopal morado			Nopal verde		
	ABTS	DPPH	FRAP	ABTS	DPPH	FRAP
Fenoles	-0.510	0.999*	0.984	0.437	-0.359	0.098
Flavonoides	-0.578	-0.368	-0.238	0.292	-0.500	-0.058
Betacianinas	-0.102	0.889	0.818	-	-	-
Betaxantinas	-0.984	0.687	0.779	-	-	-

*La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

estos se correlacionaron de manera negativa con la capacidad antioxidante de ABTS ($r = -0.578$), DPPH ($r = -0.368$) y FRAP ($r = -0.238$). Los compuestos de betacianinas presentaron una correlación positiva para la capacidad antioxidante por DPPH ($r = 0.889$) y FRAP ($r = 0.818$). De igual manera, las betaxantinas presentaron una correlación positiva para la capacidad antioxidante por DPPH ($r = 0.687$) y FRAP ($r = 0.779$), solamente se observó para la capacidad antioxidante por ABTS una correlación negativa de $r = -0.984$. A diferencia de los extractos en etapa de color verde, el nopal morado muestra una mayor capacidad antioxidante relacionada con los compuestos fenólicos y betacianinas, siendo estos últimos compuestos pertenecientes a las betalainas, que confieren las tonalidades rojas y se forman por condensación de una estructura ciclo-DOPA (dihidroxifenilalanina) con el ácido betalámico (García *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Los extractos de *O. gosseliniana* presentaron capacidad antioxidante, contenido de fenoles totales en ambas etapas de coloración, siendo el extracto en etapa morada el que obtuvo los valores más altos tanto en las pruebas de actividad antioxidante como en el contenido de fenoles y flavonoides totales. Los extractos de nopal verde mostraron un grado de toxicidad más alto en comparación con el nopal morado, de acuerdo con su nivel de clasificación, siendo este último, el extracto de interés para futuras pruebas, con el fin de lograr un adecuado tratamiento de la planta en esta etapa de coloración. Solo en el extracto en etapa morada se obtuvieron valores de betalainas, por lo tanto, se recomienda continuar con los ensayos para la obtención de dicho pigmento vegetal, el cual es una fuente potencial de aprovechamiento a nivel agroindustrial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo a PRODEP por el financiamiento otorgado y al CONACyT por la beca de estudios de posgrado del primer autor.

REFERENCIAS

- Aguilar, M. V. R., Jaramillo, C. G. J. y de Astudillo, L. L. R. 2018. Contenido de betalainas y actividad antioxidante en brácteas de *Bougainvillea glabra* Choisy. Revista Cubana de Farmacia. 51(2). <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/226>
- Astello-García, M. G., Cervantes, I., Nair, V., del Socorro Santos-Díaz, M., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F. y de la Rosa, A. P. B. 2015. Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia spp.* cultivars with different domestication gradient. Journal of Food Composition and Analysis. 43: 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.04.016>
- Bayar, N., Kriaa, M. y Kammoun, R. 2016. Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. International Journal of Biological Macromolecules. 92: 441-450. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.042>

- Benayad, Z., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez-Cordoves, C. y Es-Safi, N. E. 2014. Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*. 62: 412-420. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.046>
- Cardador-Martínez, A., Jiménez-Martínez, C. y Sandoval, G. 2011. Revalorization of cactus pear (*Opuntia spp.*) wastes as a source of antioxidants. *Food Science and Technology*. 31(3): 782-788. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300036>
- Fernández-Calienes Valdés, A., Mendiola-Martínez, J., Monzote-Fidalgo, L., García-Parra, M., Sariego-Ramos, I., Acuña-Rodríguez, D. y Gutiérrez-Gaitén, Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 61(3): 254-258.
- García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y. y Valle-Guadarrama, S. 2012. Betalaínas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus griseus H.*). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35 (SPE5): 1-5.
- Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W. y de la Rosa, A. P. B. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia spp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*. 23(6): 525-532. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.003>
- Khatabi, O., Hanine, H., Elothmani, D. y Hasib, A. 2016. Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*). *Arabian Journal of Chemistry*. 9 (Supplement 1): S278-S281. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.04.001>
- Maki-Díaz, G., Peña-Valdivia, C.B., García-Nava, R., Arévalo-Galarza, M.L., Calderón-Zavala, G. y Anaya-Rosales, S. 2015. Características físicas y químicas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) para exportación y consumo nacional. *Agrociencia*. 49(1): 31-51. Recuperado en 20 de enero de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952015000100003&lng=es&tlng=es.
- Martins, D., Fachin-Espinar, M. T., de Oliveira, T. A., Lima, K. C., Cavalcanti, R. M., Teles, B. R. y Nunez, C. V. 2014. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2(6): 158-171. http://jppres.com/jppres/pdf/vol2/jppres14.036_2.6.158.pfd
- Moein, S. y Moein, M. R. 2010. Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(7): 517-521. Available online at <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H. y Parajó, J. C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72(2): 145-171. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)
- Osorio-Esquivel, O., Álvarez, V. B., Dorantes-Álvarez, L. y Giusti, M. M. 2011. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International*. 44(7): 2160-2168. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.011>
- Pérez-Pérez, L. M., Sánchez, C. L. D. T., Chavez, E. S., Vega, R. I. G., Díaz, A. R., Flores, J. B. y Flores-Cordova, M. A. 2020. Bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) en México, mediante un sistema gastrointestinal *in vitro*. *Biotecnia*. 22(1): 117-125. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i1.1159>
- Ramírez-Ramos, M., García-Mateos, M. R., Corrales-García, J., Ybarra-Moncada, C. y Castillo-González, A.M. 2015. Compuestos antioxidantes en variedades pigmentadas de tuna (*Opuntia sp.*). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 38(4): 349-357.
- Ramos, K. O., Sánchez, Y. H., Pérez, N. V. y Villafaña, O. P. 2012. Actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus spp.* (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17(4): 368-379.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical*

Development of a biomaterial based on starch-gelatin blends: Physical, mechanical and barrier properties

Desarrollo de un biomaterial a base de mezcla almidón-gelatina: Propiedades físicas, mecánicas y de barrera

Pérez-Marroquín XA¹, Vargas-Torres A¹, Campos-Montiel RG¹, Callejas-Quijada G¹, Campos-Lozada G¹, León-López A², Aguirre-Álvarez G^{1,3*}

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

² Instituto Tecnológico Superior de Venustiano Carranza, Av. Tecnológico s/n, Col. El Huasteco, C.P. 73049. Ciudad Lázaro Cárdenas, Venustiano Carranza, Puebla.

³ Uni-Collagen S.A. de C.V., Arnulfo González No. 203, El Paraíso, Tulancingo C.P. 43684, Hidalgo, México.

ABSTRACT

Films made from a mixture of Chayotextle starch-Gelatin (SG) were prepared according to the following concentrations SG 3:1, SG 2:2, and SG 1:3. Two controls were considered; gelatin (G) and starch (S) films. Glycerol was added as a plasticizer to all treatments at 2 %. The aim of this research was the study of the effect of different concentrations of chayotextle starch and gelatin on the physical, mechanical and barrier properties of films. G treatment presented higher solubility in comparison to those treatments with presence of starch. FT-IR exhibited the characteristic molecular fingerprint of gelatin and starch. There was not detected new bands in the spectrometers of the mixed films. The lowest percentage of crystallinity appeared in SG 2:2 films with 37.8 %. This value increased up to 64.9 % in the G treatment. The variation of ratios in the mixture starch-gelatin produced differences in structure and properties of films. These properties could be configured, adapted and applied according to the requirements of the food engineering, pharmaceutical, and biomedical industry.

Keywords: Chayotextle, Films, Gelatin, mechanical properties, starch.

RESUMEN

Se prepararon películas a base de una mezcla de almidón de chayotextle y gelatina (SG) de acuerdo a las siguientes concentraciones SG 3:1, SG 2:2, y SG 1:3. Dos controles fueron considerados en las películas; gelatina (G) y almidón (S). Se adicionó glicerol como plastificante para todos los tratamientos en un 2 %. El objetivo de esta investigación fue el estudio del efecto de las diferentes concentraciones de almidón de chayotextle y gelatina en las propiedades físicas, mecánicas y de barrera de las películas. El tratamiento G presentó la más alta solubilidad comparado con aquellos tratamientos en los que se incluyó al almidón. Los resultados FT-IR exhibieron la huella molecular característica de la gelatina y del almidón. No se detectaron nuevas bandas en los espectrómetros de las mezclas de gelatina. El más bajo porcentaje de cristalinidad apareció en las películas SG 2:2 con 37.8%. Este valor incrementó hasta un 64.9% en el tratamiento G. La variación de porcentajes en las mezclas

almidón-gelatina produjo diferencias en las estructura y propiedades de las películas. Estas propiedades podrían ser configuradas, adaptadas y aplicadas de acuerdo a los requerimientos de la industria de ingeniería de alimentos, farmacéutica y biomédica.

Palabras clave: Chayotextle, películas, Gelatina, propiedades mecánicas, almidón.

INTRODUCTION

Synthetic plastics are commonly extracted from petroleum. They are traditionally used as containers due to their high obtainability, low cost and good mechanical properties. However, it is well known that these synthetic materials affect significantly the environment due to their low degradability (Li *et al.*, 2016). Bio-friendly materials based on natural sources are the focal point of interest of many researchers, due to their advantages such as ecological nature and its reusability (Mittal *et al.*, 2016). The elaboration of films made from polysaccharides and proteins can play an important role in the future of the preservation and packaging of foods (Aila-Suárez *et al.*, 2013). Chayotextle (*Sechium edule*) is a native cucurbit plant of Mexico. Its roots commonly called chayotextle are edible and contain plenty of starch (89.1%) with the amylose/amylopectin ratio of 12.09 % and 87.10 % respectively. It possesses an alkaline pH value of about 8.12 and lower gelatinization temperature (Jiménez-Hernández *et al.*, 2007). Few studies have been conducted on the isolation (Hernandez-Urbe *et al.*, 2011) and characterization (Aila-Suárez *et al.*, 2013) of this new biopolymer. On the other side, gelatin is different from other hydrocolloids because of its properties as a digestible protein (Duconseille *et al.*, 2015) and film formation capacity (Hosseini *et al.*, 2016). Gelatin is extracted from a variety of sources, such as animal skin, bones, and connective tissues. It is produced by the partial hydrolysis of native collagen containing between 85 and 92 % protein content.

The mixture of starch with gelatin, has been reported to increase the mechanical properties of films in terms of higher resistance and elongation (Moreno *et al.*, 2017). Starch is a polysaccharide widely used worldwide, despite this advantage, few studies have been conducted on chayotextle

*Autor para correspondencia: Gabriel Aguirre Álvarez
 Correo electrónico: aguirre@uaeh.edu.mx

Recibido: 9 de febrero de 2022

Aceptado: 27 de junio de 2022

starch which is considered as a new and innovator biopolymer with different applications. Films prepared with starch possess some disadvantages such as fragility, hydrophilicity, poor resistance to external factors and mechanical properties. However, starch films have advantages as a potential packaging material: natural, renewable, widely available, non-toxic, biodegradable and cheap (Zarski, 2021). Also, the films prepared with gelatin are an ideal material for food packaging due to its versatile advantages such as biodegradability, as well as antibacterial and antioxidant properties in foods. Nevertheless, gelatin films possess poor waterproof and mechanical properties (Lu, 2022). The main purpose of this study consisted in the development of a biomaterial prepared with a blend of Chayotextle starch and gelatin. Also, some properties such as mechanical, molecular, permeability and solubility were investigated.

MATERIALS AND METHODS

For the preparation of films, the followings materials were used: Wilson PS 30 mesh gelatin with 275°B (Gelita, Mx), chayotextle starch and glycerol (Meyer, Mx).

Preparation of films

Isolation of chayotextle starch powder was carried out according to the methodology developed by Hernandez-Uribe *et al.* (2011). Five treatments of filmogenic solution were prepared according to Table 1.

Table 1. Composition of films considering different ratios of blends.

Tabla 1. Composición de películas considerando diferentes proporciones de mezclas.

Sample	Starch (g)	Gelatin (g)	Glycerol (mL)	Distilled water (mL)
S	4	0	2	180
SG 3:1	3	1	2	180
SG 2:2	2	2	2	180
SG 1:3	1	3	2	180
G	0	4	2	180

Firstly, 160 mL of distilled water were added to a mini-reactor (300 mL) followed by 2 g of glycerol and 10 min of stirring (Lightning Lab MasterSPX-Mixer). Different treatments of 4, 3, 2, 1, and 0 g of chayotextle starch were added to the corresponding reactor. The temperature solution was raised at 85 °C for 10 min. The solution was cooled down to 60 °C to add gelatin. Secondly, 0, 1, 2, 3 and 4 g of porcine gelatin with 275°B (Wilson Porcine Skin) were placed in a corresponding flask containing 20 mL of water at room temperature for swelling of gelatin. After 10 min of swelling, the temperature of the gelatin solution was increased to 55 °C and maintained for 10 min with constant stirring for melting of gelatin. The melted gelatin was added to the starch-glycerol solution and stirred for 10 min to homogenize the mixture.

From these gelatin-starch-glycerol mixtures, 60 g of each filmogenic solution were placed in 13 cm-diameter petri dishes. Once the solutions cooled down at room tem-

perature, they were dried in a digitally controlled drying oven (Felisa) at 25 °C for 72 hrs. Then, films were peeled off from the substrate and cut into strips (10 mm x 100 mm). Average thickness was 0.1 ± 0.005 mm.

Conditioning of samples

Films were stored for seven days over P₂O₅ (0 % R.H.) for a maximum removal of water in a plastic desiccator with a button lid (Thermo Scientific®). After this storage time, films reported 2.3 ± 0.1 % dry basis of water content. Then, strips were stored over a salt solution (K₂CO₃= 44 % R.H.) in a sealed box for 7 days to equilibrate the water content at 15 % dry basis. After the conditioning time, samples were ready for mechanical and structural properties testing.

Tensile strength performance test

The films were clamped in the texture analyzer machine (Brookfield CT3 Analyzer). The distance between tensile grips was 50 mm. It was considered as the original length of the sample for strain calculation. Settings for the machine were; test mode = tension; test speed = 0.10 mm/sec; distance = 30 mm. The performance of the mechanical properties of films was assessed by stretching the sample from its original length, until the sample was fractured.

Calculations

The resistance of the films to elongation at small deformation is called Young's Modulus (E) (Sperling, 2006). This was calculated from the linear region of the curve at 0.5 mm of strain as follows in equation 1:

$$E = \frac{(\text{Gradient} * \Delta L)}{(t * w) * 10^9}$$

Where: E = Young's Modulus (GPa); Gradient = Slope of the curve at 0.5 mm of strain (N/mm); ΔL = increment of length (mm); t = thickness (m); w = width of the film (m).

The stress at break and strain at break were obtained from the maximum force and distance of the tensile strength curve.

Fourier Transform Infrared

The absorption spectres were obtained on a Frontier FT-IR (Perkin Elmer) equipped with attenuated total reflectance (ATR). The interval of measurement was from 400 to 4,000 cm⁻¹ at room temperature. The automatic signals were recollected in 3260 scans at a resolution of 1 cm⁻¹ and digitalized with the spectrum 10 software.

X-Ray

The grade of crystallinity was measured in a Bruker (D2 PHASER Second generation) diffractometer. Films samples were cut into 2.4 cm diameter-circles. A divergence apparatus was used at 0.6 mm and the data recollected were in a range of 2 θ from 5 ° to 80 ° at a speed of 1°/min; 30 mA and 40 kV. The calculations of both amorphous and crystalline content of films were calculated with the Diffrac.suite-EVA software.

Solubility and permeability of films

Previous to the solubility test, samples were stored in a desiccator for 7 days to remove water. The solubility was performed according to Garcia *et al.* (2004), with some modifications. Samples sized 2 x 3 cm were weighed and placed in glass vessels containing 80 mL of distilled water and kept under constant stirring for 1 h at 25° C. Samples were dried at 70 °C for 2 h. The solubility percentage was calculated with the following equation:

$$\text{Percentage solubility} = \frac{\text{initial dry weight} - \text{final dry weight}}{\text{initial dry weight}} \times 100$$

The permeability to water vapor in films was determined employing the standard gravimetric method of the ASTM, E 96-80 (ASTM, 1989) better known as “the test cell”.

Statistical analysis

A randomized design experiment and an analysis of variance (ANOVA) were applied to experimental data which included a Tukey test ($P \leq 0.05$). Data were analyzed with the IBM SPSS v25.0 software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Ten replicates per treatment were considered in this experiment.

RESULTS AND DISCUSSION

Mechanical properties

The resistance of films to fracture is an important parameter that describes the structural conformation of films. The mechanical performance of this biomaterial could be of great importance when applied as a protector for food products, as well as pharmaceutical applications. Figure 1 shows that the interaction of the two biopolymers affected the young’s module (E) significantly ($P < 0.05$). The viscoelastic properties of films appeared to decrease as the amount of gelatin increased. Starch films showed 5MPa and the addition of protein decreased E up to 1MPa at the SG 1:3 ratio. These results agree very well with those obtained for previous work, carried out with sago starch and fish gelatin (Al-Hassan and Norziah, 2012). The water/gelatin/starch interactions are mainly produced through hydroxyl groups of starch chains. Also, the presence of small molecules such as water increase the possibility of interaction through hydrogen bonding between starch and gelatin (Tolstoguzov, 1994).

The fracture properties of films represented for the tensile strength and elongation at break demonstrated that the presence of gelatin in films produced brittle continuous networks with large deformation properties. The increment of gelatin in all formulation with starch reduced the elongation at break parameter as a result of the interaction between hydroxyl groups of both starch and gelatin (Al-Hassan and Norziah, 2012). G sample reflected the highest force applied to fracture with 0.15 MPa. These results suggest that there was a better degree of crosslinking in this particular sample. The formation of films in samples with presence of starch was attributed to the entanglement of amorphous chains rather than ordered aggregates or junction points (Kramer, 2009; Wang *et al.*, 2017). The films formulated with starch resulted

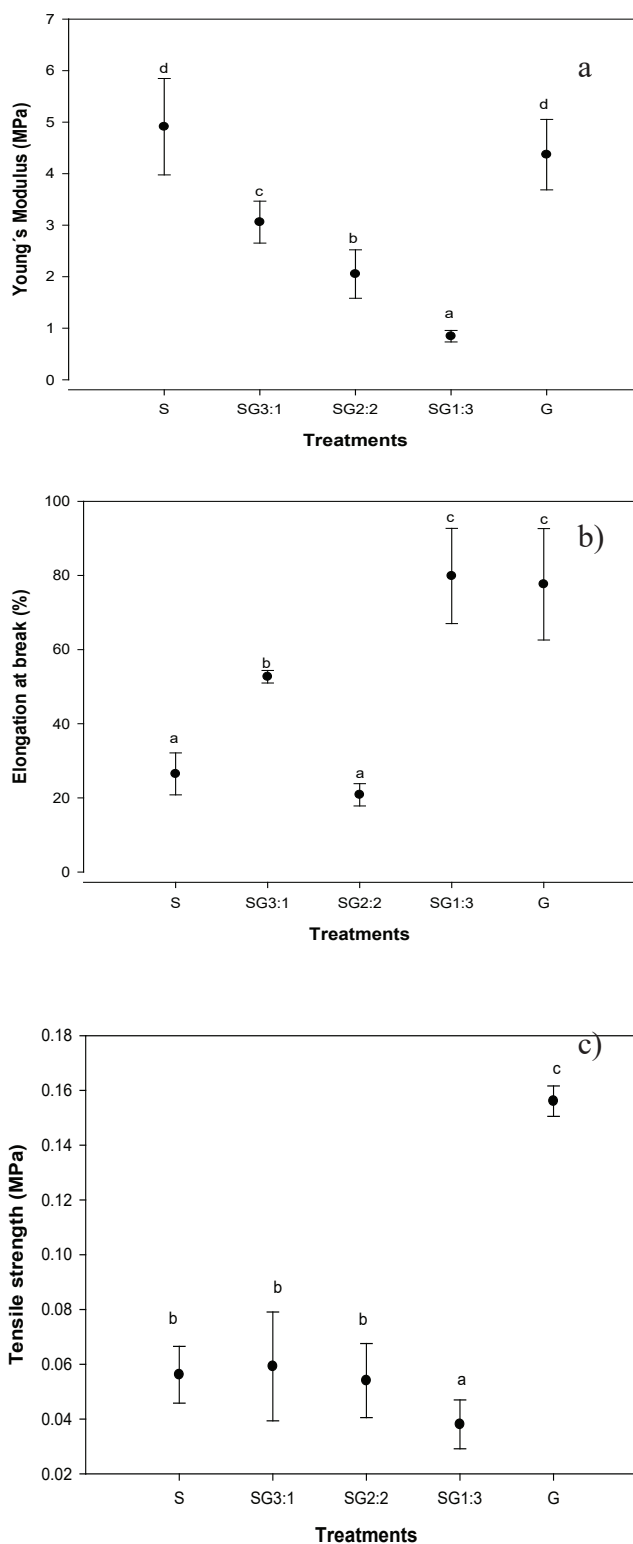


Figure 1: Mechanical properties of gelatin-starch films. a) Young’s modulus, b) Tensile strength, c) Elongation at break. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$). Error bars represent 1 SD of 10 replicates.

Figura 1: Propiedades mecánicas de películas de gelatina-almidón. a) Módulo de Young, b) Fuerza a la ruptura, c) Elasticidad. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$). Las barras de error representan 1 DE de 10 repeticiones.

with limited mechanical properties such as fragile and brittle (Wang *et al.*, 2007). The growing interactions between the hydroxyl groups in glycerol and carboxyl groups of amyloses in starch and gelatin, could increase interfacial interactions between these biopolymers avoiding weak links that create strain in the bio composed matrix.

The elongation at break depends, as tensile strength do, on different factors in mixed system between starch and gelatin which include the hydrogen bonding through their hydroxyl groups. The anionic domains of starch form a network with the cationic domains of gelatin molecules between anionic ones (Fonkwe *et al.*, 2003). G sample and the SG 1:3 mixture showed the highest deformation with 80% compared to the rest of the samples. Previous work carried out in gelatin films in presence of glycerol, have shown that glycerol is compatible with gelatin, and increases significantly its plasticity resulting in higher flexibility and transparency (Al-Hassan and Norziah, 2012; Park *et al.*, 2008).

FT-IR spectroscopy

The rheological and mechanical properties of both starch and gelatin depend on their morphology, particularly on their grade of homogeneity and the composition of the continuous and disperse phase (Liu *et al.*, 2014). Figure 2 shows the FTIR transmission spectra of typical gelatin and starch films. The spectral characteristics for gelatin are amide I and II bands which are located approximately at 1650 and 1547 cm^{-1} respectively. The absorption of amide I was mainly due to the vibration of elongation of the C=O link and amide II peaks resulted from the flexion of the N-H link and elongation of the C-N link. The CO and CC groups were observed at 1236 cm^{-1} . They were related to conformation of crystalline region of starch (Mutungi *et al.*, 2011). The bands of absorption at approximately 1150, 1125 and 1105 cm^{-1} were due to CO, CC extending to some contributions of COH and related modes with CH_2 . For starch a series of peaks overlapping located in

the region of 1180-953 cm^{-1} were more intense bands. Also, 3400-3100, 3000-2700 cm^{-1} bands belong to an extension of vibrations between OH and CH respectively (Muyonga *et al.*, 2004). It was observed that all the bands of absorptions appeared according to the origin of single materials and there were not observed new bands for blends (see Figure 3).

Degree of crystallinity in films

Films presented a pattern of diffraction characteristic of a partially crystalline material. Figure 4 shows the typical diffractograms for G and S sample. G sample showed peaks located in the region around 7° and 20° (Tao *et al.*, 2018). These peaks are associated with diameter and intensity of the triple helix structure reconstructed from collagen (Rivero *et al.*, 2010).

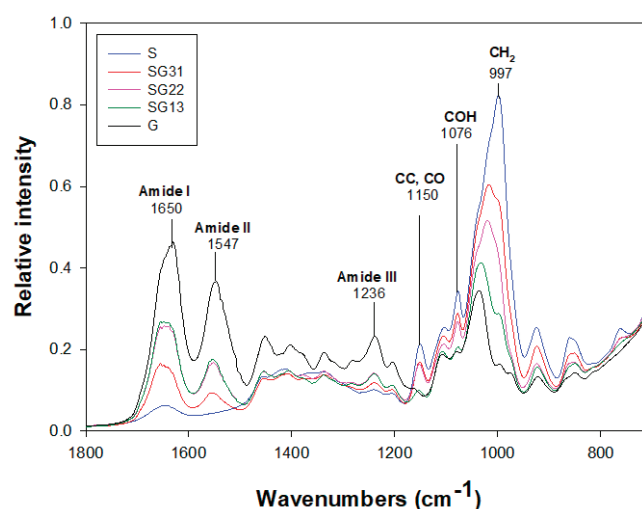


Figure 3: Behaviour of the FT-IR spectra of films as a function of gelatin-starch mixing ratios.

Figura 3: Comportamiento de los espectros FT-IR en películas en función de los diferentes grados de mezclas de gelatina y almidón.

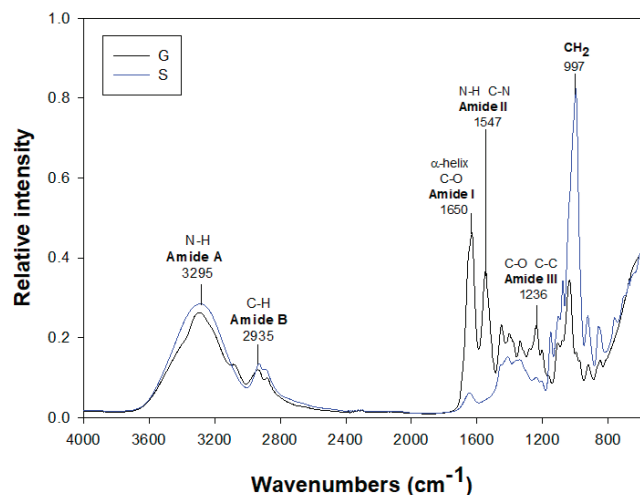


Figure 2: Comparison of FT-IR spectra of films from gelatin vs starch.

Figura 2: Comparación del espectro FT-IR entre películas de gelatina almidón.

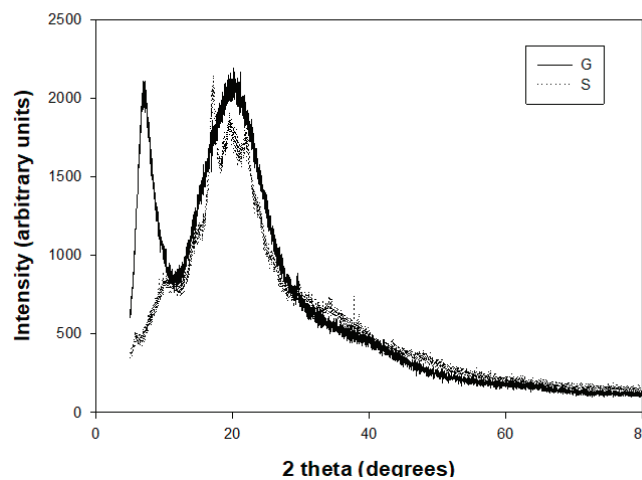


Figure 4: X-ray diffraction patterns of gelatin and starch films.

Figura 4: Patrones en la difracción de rayos X en películas de gelatina y almidón.

Functional groups of gelatin interfered with the re-assembly of the structure during the film structure formation process (Wang *et al.*, 2017). Previous works on gelatin films (Bigi *et al.*, 2004) have shown that the peak around 7° is related with the diameter of the triple helix and its intensity is associated with the content of the triple helix in films. Peaks presented in starch film at 17°, 20° and 22° were characteristic of crystal proportions that remained in films after heating the sample before preparation of films. It means that thermal energy proportioned at 85°C in the preparation of film was not enough to unchain complete gelatinization of that phase in starch (Gao *et al.*, 2021). However, this thermal treatment unchained a rupture in the granule of starch releasing amylose and amylopectin in the filmogenic solution (Kramer, 2009).

From Table 2, it can be observed that S sample reported significant differences ($P < 0.05$) with 55.15 % of amorphous content and 44.83% of crystalline content. Comparing these results with G sample, a lower amount of amorphous content (35.03 %) was observed. However, the amorphous content of mixed samples resulted significantly ($P < 0.05$) higher compared to Gelatin. The SG 2:2 sample showed the higher content with 62.13 %. The higher the amount of starch in films formulation, the greater the amorphous proportion was measured.

Table 2. Degree of Crystallinity in gelatin-starch films. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$). Each value represents the average of 3 replicates.

Tabla 2. Grado de cristalinidad en películas de almidón-gelatina. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$). Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones.

Sample	Amorphous content (%)	Crystalline content (%)
S	55.16 ± 2.98 ^{bc}	44.83 ± 2.98 ^{ab}
SG 3:1	46.02 ± 4 ^{ab}	53.97 ± 4 ^{bc}
SG 2:2	62.13 ± 1.39 ^c	37.86 ± 1.39 ^a
SG 1:3	55.09 ± 1.69 ^b	43.90 ± 0.88 ^{ab}
G	35.03 ± 8.82 ^a	64.96 ± 8.82 ^c

During the drying of the film solutions, the molecules followed a tendency to reorganize towards its native structure (Ledward, 1986; Parker and Ring, 2005). The speed of drying in S treatments were higher than the speed of the reorganization of its structure, resulting in a predominance of the amorphous proportion in films. However, the G film reached a partial reorganization to collagen-like structure before the filmogenic solution dried (Aguirre-Álvarez *et al.*, 2011). The films from samples SG 3:1, SG 2:2, SG1:3 and G were produced from gel to solid state with a more ordered structure. This behavior is congruent with the observed data in the determination of crystallinity as the G films presented 64.96 % of crystallinity. The ratio of crystallinity decreased with the presence of starch in the filmogenic solution up to 37.86 % in the SG 2:2 sample. This could be the reason why the sample G resulted more brittle and with higher tensile strength compared to the rest of the samples.

Solubility of films

The solubility of edible films such as starch-gelatin results of greater importance when applied as a packaging material in foods. Figure 5 shows significant differences between treatments ($P < 0.05$). The higher the amount of gelatin, the higher the solubility of films.

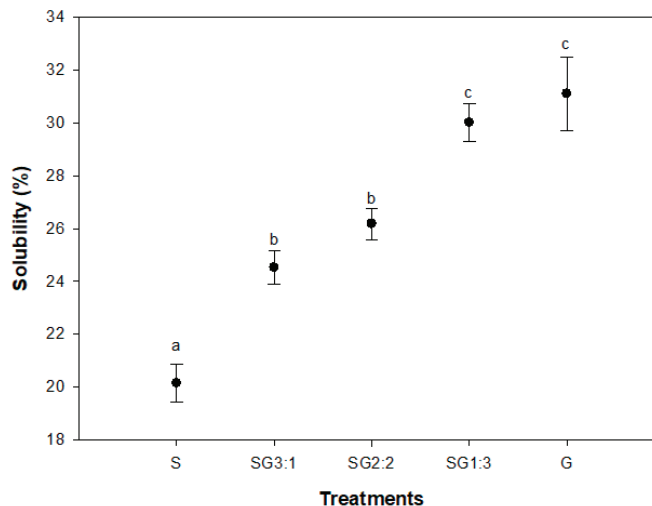


Figure 5: Solubility of gelatin-starch films. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$). Error bars represent 1 SD of 3 replicates.

Figura 5: Solubilidad de películas de gelatina-almidón. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$). Las barras de error representan 1 DE de 3 repeticiones.

The reduction in film solubility could be attributed to the physical interference when starch interacts with gelatin chains entanglement within the film matrix (Guo *et al.*, 2014). The preparation of films involved a thermal treatment of native starch. This process of gelatinization produced very reactive OH groups when exposed to water (Sun *et al.*, 2013). However, blends of starch and gelatin interact each other by means of hydrogen bonds blocking hydroxyl positions capable of association with water (Ahmad and Sarbon, 2021; Flores *et al.*, 2010). The presence of gelatin in the mixtures increased this solubility significantly up to approximately 30 % for SG 1:3. This particular sample showed no significant differences ($P > 0.05$) with G treatment prepared only with gelatin and glycerol. These results were lower compared to those reported for films prepared with fish gelatin and chitosan (Fakhreddin Hosseini *et al.*, 2013), chicken skin and tapioca starch (Loo and Sarbon, 2020) and gelatin with potato starch (Aitboulahsen *et al.*, 2020). It is well known that gelatin possesses hydrophilic properties due to some amino acids such as lysine, serine, arginine, hydroxyproline, and aspartic and glutamic acids (Schrieber and Gareis, 2007; Theerawitayaart *et al.*, 2019). These results suggest that addition of starch to gelatin films reduces the gelatin degree of solubility due to electrostatic forces undergoing associative interactions to form a polyelectrolyte complex, which may cause the reduction in water solubility (Fakhreddin Hosseini *et al.*, 2013).

The barrier properties of starch-gelatin films

The water vapor permeability (WVP) is the flux of molecules through a material normalized to a pressure gradient (Tyuftin and Kerry, 2021). WVP of films prepared with starch (S) resulted in greater amount compared to the films prepared with gelatin. Figure 6 shows that the presence of gelatin decreased the WVP no matter what the amount of gelatin was added. Sample S showed high WVP due to its abundance of hydrophilic hydroxyl groups present within amylose concentration of chayotextle starch. This affinity to water molecules promoted the migration of water vapor molecules through the film (Alias and Mhd Sarbon, 2019). The same trend was observed in previous work carried out in films prepared with sago starch-gelatin and glycerol (Al-Hassan and Norziah, 2012). The greater the amount of starch, the higher the WVP was obtained. For treatments in presence of gelatin, it is believed that the starch hydroxyl groups interacted easily with gelatin amino groups via hydrogen bonds to form physically reticulated networks with more compact structure between starch and gelatin, reducing permeation of water molecules into the matrix of films (Ahmad *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2005). This behavior could be explained in terms of differences in structural properties as the hydrophilic character of the matrix promoted different transport rates of water adsorption capacity in films containing gelatin (Moreno *et al.*, 2016). Previous works have demonstrated that WVP of films depended on several factor such as the ratio between the amorphous and crystalline zones (Garcia *et al.*, 2000), and the greater the crystalline/amorphous ratio, the lower the permeability (Donhowe and Fennema, 1993). The same behavior was observed in films prepared with chayotextle starch and cellulose nanoparticles (Aila-Suárez *et al.*, 2013), the higher the amount of cellulose nanoparticle, the higher the crystallinity of films was obtained, shifting the WVP to lower values.

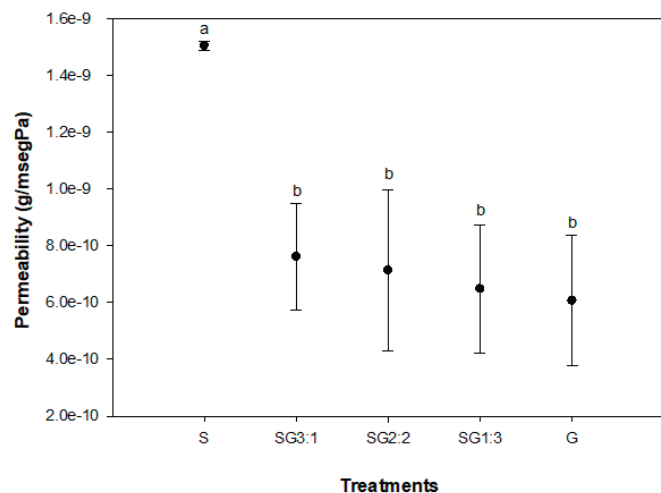


Figure 6: Water Vapour Permeability of films prepared from gelatin and Chayotextle starch. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$). Error bars represent 1 SD of 3 replicates.

Figura 6: Permeabilidad de vapor de agua en películas de gelatina-almidón. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$). Las barras de error representan 1 DE de 3 repeticiones.

CONCLUSION

The characterization of starch-gelatin films was successful by obtaining films with a diversity of characteristics of resistance, solubility and permeable abilities. The films prepared with gelatin resulted more brittle and rigid. However, the addition of starch changed significantly the characteristics of the films presenting lower rigidity and solubility properties. Based on the interaction of starch and gelatin in the mixed systems, it is concluded that structural properties in films can be adapted to the needs and requirements of different industries such as pharmaceutical, biomedical and food engineering. As examples, the following applications of these biomaterials could be mentioned: coatings and packaging of fresh meat, coating of fruits and vegetables, soft gel capsules contained, matrix for the release of drugs, bioactive ingredients, among others.

ACKNOWLEDGEMENT

The first author gratefully acknowledges to Uni-Collagen S.A. de C.V. and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for their financial support. Grant number: 928897.

REFERENCES

- Aguirre-Álvarez, G., Pimentel-Gonzalez, D. J., Campos-Montiel, R. G., Foster, T., and Hill, S. E. 2011. The effect of drying temperature on mechanical properties of pig skin gelatin films. *Cyta-Journal of Food*, 9(3): 243-249.
- Ahmad, A. A., and Sarbon, N. M. 2021. A comparative study: Physical, mechanical and antibacterial properties of bio-composite gelatin films as influenced by chitosan and zinc oxide nanoparticles incorporation. *Food Bioscience*, 43: 101250.
- Ahmad, M., Hani, N. M., Nirmal, N. P., Fazial, F. F., Mohtar, N. F., and Romli, S. R. 2015. Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish gelatin/rice flour fabricated by casting technique. *Progress in Organic Coatings*, 84: 115-127.
- Aila-Suárez, S., Palma-Rodríguez, H. M., Rodríguez-Hernández, A. I., Hernández-Urbe, J. P., Bello-Pérez, L. A., and Vargas-Torres, A. 2013. Characterization of films made with chayote tuber and potato starches blending with cellulose nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 98(1): 102-107.
- Aitboulahsen, M., El Galiou, O., Laglaoui, A., Bakkali, M., and Hassani Zerrouk, M. 2020. Effect of plasticizer type and essential oils on mechanical, physicochemical, and antimicrobial characteristics of gelatin, starch, and pectin-based films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(6): e14480.
- Al-Hassan, A. A., and Norziah, M. H. 2012. Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26(1): 108-117.
- Alias, S. A., and Mhd Sarbon, N. 2019. Rheological, physical, and mechanical properties of chicken skin gelatin films incorporated with potato starch. *npj Science of Food*, 3(1): 26.
- ASTM. (1989). Standard test methods for water vapor transmission of materials in sheet form. E96-80 ASTM International, Philadelphia.

- Bigi, A., Panzavolta, S., and Rubini, K. 2004. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25(25): 5675-5680.
- Donhowe, I. G., and Fennema, O. 1993. Water-vapor and oxygen permeability of wax films. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70(9): 867-873.
- Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F., and Sante-Lhoutellier, V. 2015. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, 43: 360-376.
- Fakhreddin Hosseini, S., Rezaei, M., Zandi, M., and Ghavi, F. F. 2013. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chem*, 136(3-4): 1490-1495.
- Flores, S. K., Costa, D., Yamashita, F., Gerschenson, L. N., and Grossmann, M. V. 2010. Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. *Materials Science and Engineering C*, 30(1): 196-202.
- Fonkwe, L. G., Narsimhan, G., and Cha, A. S. 2003. Characterization of gelation time and texture of gelatin and gelatin-polysaccharide mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 17(6): 871-883.
- Gao, W., Zhu, J., Kang, X., Wang, B., Liu, P., Cui, B., and Abd El-Aty, A. M. 2021. Development and characterization of starch films prepared by extrusion blowing: The synergistic plasticizing effect of water and glycerol. *LWT*, 148: 111820.
- García, M. A., Martino, M. N., and Zaritzky, N. E. 2000. Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch-Starke*, 52(4): 118-124.
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., and Zaritzky, N. E. 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56(3): 339-345.
- Guo, J., Ge, L., Li, X., Mu, C., and Li, D. 2014. Periodate oxidation of xanthan gum and its crosslinking effects on gelatin-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 2014 v.39: pp. 243-250.
- Hernandez-Urbe, J., Agama, E., Gonzalez-Soto, R., Bello-Pérez, L., and Vargas-Torres, A. 2011. Isolation and characterization of Mexican chayote tuber (*Sechium edule* Sw.) starch. *Starch - Stärke*, 63.
- Hosseini, S. F., Javidi, Z., and Rezaei, M. 2016. Efficient gas barrier properties of multi-layer films based on poly(lactic acid) and fish gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92: 1205-1214.
- Jiménez-Hernández, J., Salazar-Montoya, J. A., and Ramos-Ramírez, E. G. 2007. Physical, chemical and microscopic characterization of a new starch from chayote (*Sechium edule*) tuber and its comparison with potato and maize starches. *Carbohydrate Polymers*, 68(4): 679-686.
- Kramer, M. E. 2009. Structure and function of starch-based edible films and coatings. In M. E. Embuscado and K. C. Hubber (Eds.), *Edible films and coatings for food applications* (pp. 113-134). New York, USA: Springer Science.
- Ledward, D. A. 1986. Gelation of gelatin. In J. R. Mitchell and D. A. Ledward (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 171-202). London, U.K.: Elsevier Applied Sciences Publishers LTD.
- Li, W. C., Tse, H. F., and Fok, L. 2016. Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Science of The Total Environment*, 566-567: 333-349.
- Liu, X.-x., Wang, Y.-f., Zhang, N.-z., Shanks, R. A., Liu, H.-s., Tong, Z., . . . Yu, L. 2014. Morphology and phase composition of gelatin-starch blends. *Chinese Journal of Polymer Science*, 32(1): 108-114.
- Loo, C. P. Y., and Sarbon, N. M. 2020. Chicken skin gelatin films with tapioca starch. *Food Bioscience*, 35: 100589.
- Mittal, A., Garg, S., Kohli, D., Maiti, M., Jana, A. K., and Bajpai, S. 2016. Effect of cross linking of PVA/starch and reinforcement of modified barley husk on the properties of composite films. *Carbohydrate Polymers*, 151: 926-938.
- Moreno, O., Cardenas, J., Atares, L., and Chiralt, A. 2017. Influence of starch oxidation on the functionality of starch-gelatin based active films. *Carbohydrate Polymers*, 178: 147-158.
- Moreno, O., Diaz, R., Atares, L., and Chiralt, A. 2016. Influence of the processing method and antimicrobial agents on properties of starch-gelatin biodegradable films. *Polymer International*, 65(8): 905-914.
- Mutungi, C., Onyango, C., Doert, T., Paasch, S., Thiele, S., Machill, S., . . . Rohm, H. 2011. Long- and short-range structural changes of recrystallised cassava starch subjected to in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, 25(3): 477-485.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., and Duodu, K. G. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 86(3): 325-332.
- Park, J. W., Scott Whiteside, W., and Cho, S. Y. 2008. Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. *LWT - Food Science and Technology*, 41(4): 692-700.
- Parker, R., and Ring, S. G. 2005. *The Physical Chemistry of Starch*. In S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility* (Second ed., pp. 591-624). New York, USA: Marcel Dekker.
- Rivero, S., García, M. A., and Pinotti, A. 2010. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2): 369-375.
- Schrieber, R., and Gareis, H. 2007. *Gelatine handbook. Theory and industrial practice* Weinheim, Germany: Wiley-VCH
- Sperling, L. H. 2006. *Introduction to physical polymer science* (Fourth ed.). New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Sun, Q., Sun, C., and Xiong, L. 2013. Mechanical, barrier and morphological properties of pea starch and peanut protein isolate blend films. *Carbohydrate Polymers*, 98(1): 630-637.
- Tao, F., Shi, C., and Cui, Y. 2018. Preparation and physicochemistry properties of smart edible films based on gelatin-starch nanoparticles. *J Sci Food Agric*, 98(14): 5470-5478.
- Theerawitayaart, W., Prodpran, T., and Benjakul, S. 2019. Enhancement of Hydrophobicity of Fish Skin Gelatin via Molecular Modification with Oxidized Linoleic Acid. *Journal of Chemistry*, 2019: 5462471.
- Tolstoguzov, V. B. 1994. Some physicochemical aspects of protein processing in foods. In G. O. Phillips, P. A. Williams, and D. J. Wedlock (Eds.), *Gums and stabilizers for the food industry* (Vol. 7, pp. 115-154). Oxford: Oxford University Press.
- Tyufin, A. A., and Kerry, J. P. 2021. Gelatin films: Study review of barrier properties and implications for future studies employing biopolymer films. *Food Packaging and Shelf Life*, 29: 100688.

- Wang, K., Wang, W. H., Ye, R., Xiao, J. D., Liu, Y. W., Ding, J. S., . . . Liu, A. J. 2017. Mechanical and barrier properties of maize starch - gelatin composite films: effects of amylose content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11): 3613-3622.
- Wang, L. Z., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J. F., and Kerry, J. P. 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9): 1128-1138.
- Wang, W., Wang, K., Xiao, J., Liu, Y., Zhao, Y., and Liu, A. 2017. Performance of high amylose starch-composited gelatin films influenced by gelatinization and concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94: 258-265.
- Xu, Y. X., Kim, K. M., Hanna, M. A., and Nag, D. 2005. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21(2): 185-192.

Impacto de la conductividad eléctrica de la solución nutritiva en la biomasa, pigmentos fotosintéticos y compuestos nitrogenados en lechuga

Impact of the nutritive solution electrical conductivity on lettuce biomass, photosynthetic pigments and nitrogen compounds

García-Terrazas MI¹, Santillán-Carrillo IE², Holguín-Mina R³, Sariñana-Aldaco O^{1*}

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila 25315, México.

² Secretaría de Bienestar, Durango, Durango 34139, México.

³ Departamento de Agricultura Sustentable y Protegida, Universidad Tecnológica de la Tarahumara, Guachochi, Chihuahua 33180, México.

RESUMEN

La concentración de iones en la solución nutritiva en un sistema sin suelo tiene un impacto directo en el rendimiento y calidad de los cultivos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la conductividad eléctrica de la solución nutritiva sobre la biomasa, pigmentos y compuestos nitrogenados en el cultivo de lechuga. Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar con cinco tratamientos (1, 1.5, 2, 2.5 y 3 dS m⁻¹) y nueve repeticiones. Se determinó la biomasa total (fresca y seca) y la acumulación de clorofilas, carotenoides, proteínas, aminoácidos, glutatión reducido y capacidad antioxidante hidrofílica por el método ABTS. Los resultados indicaron que la conductividad eléctrica de la solución nutritiva que mejoró la acumulación de biomasa fue la de 2.5 dS m⁻¹. La de 2 dS m⁻¹ incrementó la concentración de proteínas y aminoácidos, mientras que la de conductividad eléctrica de 3 dS m⁻¹ mejoró la concentración de pigmentos, glutatión reducido y aumentó la capacidad antioxidante, pero disminuyó el rendimiento. El manejo adecuado de la conductividad eléctrica de la solución nutritiva es un factor importante que permite mejorar el rendimiento y calidad de los cultivos en sistemas sin suelo.

Palabras clave: Nutrición vegetal, cultivo sin suelo, absorción de nutrientes, rendimiento, calidad de cultivos.

ABSTRACT

The ion concentration in the nutrient solution in a soilless system has a direct impact on the yield and quality of the crops. The objective of this research was to evaluate the effect of the electrical conductivity of the nutrient solution on the biomass, pigments and nitrogenous compounds in lettuce. A randomized complete block experimental design was used with five treatments (1, 1.5, 2, 2.5 and 3 dS m⁻¹) and nine repetitions. Total biomass (fresh and dry) and accumulation of chlorophylls, carotenoids, proteins, amino acids, reduced glutathione and hydrophilic antioxidant capacity by the ABTS method were determined. The results indicate that the electrical conductivity of the nutrient solution that improved biomass accumulation was 2.5 dS m⁻¹. The conductivity of 2 dS m⁻¹ increased proteins and amino acids, while the electrical conductivity of 3 dS m⁻¹ improved the concentration of

pigments, glutathione, and hydrophilic antioxidant capacity but decreased the yield. Proper management of the electrical conductivity of the nutrient solution is a very important factor for improving the yield and quality of crops in soilless systems.

Keywords: Plant nutrition, soilless cultivation, nutrient absorption, yield, crop quality.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la agricultura ha enfrentado diversos problemas, como la alta salinidad del suelo, la escasez de agua y altas y bajas temperaturas ambientales, que afectan negativamente la productividad de los cultivos (Jankovska-Bortkevic *et al.*, 2020; Shinde y Marathe, 2021). Una estrategia que ha permitido enfrentar algunos de estos problemas es el cultivo sin suelo, el cual permite el uso eficiente del agua y fertilizantes, debido a que la nutrición de los cultivos se lleva a cabo mediante soluciones nutritivas (SNs) (Sambo *et al.*, 2019; Shinde y Marathe, 2021). Esta técnica permite obtener incrementos en rendimiento y calidad y una disminución en la contaminación del medio ambiente (Manos y Xydis, 2019).

El uso de SNs proporciona a los cultivos las cantidades necesarias de nutrimentos, sin caer en excesos o deficiencias, sin embargo, el manejo de la SN es fundamental para obtener éxito (Sambo *et al.*, 2019). Se deben tener equilibrios químicos en la SN y controlar sus características físico-químicas para evitar la precipitación y complejación de los elementos (Sambo *et al.*, 2019). Dentro de las características a controlar destacan la conductividad eléctrica (CE), pH y temperatura, las cuales, afectan los equilibrios químicos de la SN e influyen en la absorción de los nutrimentos por las plantas (Sambo *et al.*, 2019).

El incremento del rendimiento en sistemas sin suelo no solo depende del manejo de los equilibrios iónicos y características físico-químicas de la SN, debiéndose también considerar las necesidades nutrimentales del cultivo y el sustrato o medio que se utilice como sostén (Michelon *et al.*, 2021). El aumento del rendimiento resulta del correcto funcionamiento metabólico celular, que permite la acumulación de metabolitos primarios y componentes celulares, los cuales son los responsables del aumento de biomasa en las

*Autor para correspondencia: Oscar Sariñana Aldaco
 Correo electrónico: oscarsarinana390@gmail.com

Recibido: 25 de febrero de 2022

Aceptado: 6 de junio de 2022

plantas (Hassan *et al.*, 2020). Ciertos metabolitos primarios y componentes celulares en gran parte son compuestos nitrogenados. Se sabe que el nitrógeno está implícito en la acumulación de biomasa y la correcta nutrición de las plantas (Hassan *et al.*, 2020).

La lechuga (*Lactuca sativa*) es una de las principales hortalizas de hoja con importancia económica a nivel mundial. Tiene un bajo nivel calórico y es una fuente importante de vitaminas, compuestos fenólicos, clorofilas, carotenoides y minerales (Han *et al.*, 2018; Adhikari *et al.*, 2019). La lechuga se produce en todo el mundo bajo diferentes restricciones climáticas, siendo Estados Unidos, Europa y China las principales regiones productoras (Simko *et al.*, 2014). Actualmente existe controversia sobre la CE que debe tener la SN que se aplica a la lechuga en cultivo sin suelo. Se menciona que el cultivo es sensible a la salinidad y que la CE de la SN no debe de sobrepasar los 1.5 dS m^{-1} , pero la tolerancia a la salinidad depende en gran medida de la variedad y del medio de sostén (Adhikari *et al.*, 2019; Michelon *et al.*, 2021). Algunos estudios han demostrado que al sobrepasar los 3 dS m^{-1} la absorción de agua y nutrientes disminuye, lo que provoca una menor productividad (Bilal *et al.*, 2020). El objetivo de la presente investigación fue evaluar diferentes CE de la SN para determinar su efecto en la biomasa, pigmentos y compuestos nitrogenados en lechuga romana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones experimentales

El experimento se estableció de febrero a abril del año 2021 bajo un invernadero cubierto de polietileno (Figura 1). La temperatura promedio fue de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y 50 a 60 % de humedad relativa. Semillas de lechuga romana (Paris Island Cos) fueron sembradas en bandejas de poliestireno con sustrato compuesto por una mezcla de peat moss y perlita (1:1 v/v). Las plántulas se cultivaron durante 30 días hasta que desarrollaron cuatro hojas verdaderas. Posteriormente fueron trasplantadas en bolsas negras de polipropileno de 5 kg de capacidad con la misma composición del sustrato utilizado en la siembra. El sustrato utilizado para la siembra y trasplante se desinfectó previamente con una solución de hipoclorito de sodio al 5 %.

El experimento consistió en evaluar cinco SNs con diferente CE, tomando como base la SN Steiner (Steiner, 1961). Se preparó una SN madre al 200 %, la cual se diluyó hasta obtener las CE deseadas. Las CE probadas fueron 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 dS m^{-1} . El pH de las SNs se mantuvo entre 5.8 - 6.2. Los primeros 10 días posteriores al trasplante se aplicó una SN al 25 %, para después aplicar las diferentes SNs. El cultivo se desarrolló durante 60 días después del trasplante, aplicando riegos manuales a capacidad de campo.

Diseño experimental y muestreo de plantas

La investigación se desarrolló bajo un diseño de bloques completos al azar, probando cinco tratamientos con nueve repeticiones, dando un total de 45 unidades experimentales. La evaluación de variables agronómicas se realizó



Figura 1. Apariencia de las plantas de lechuga utilizadas en el experimento bajo condiciones protegidas.

Figure 1. Appearance of lettuce plants used in the experiment under protected conditions.

en cuatro plantas seleccionadas al azar. La evaluación del contenido de diversos compuestos y capacidad antioxidante se realizó en hojas de otras cuatro plantas, cortando una hoja de la parte central de la cabeza de la lechuga de cada repetición. Las hojas se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron en un ultracongelador a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Variables agronómicas

Se determinó la biomasa fresca y seca de la cabeza y raíz mediante el uso de una balanza digital. Para la biomasa seca, el material vegetal se secó a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ en un horno por 72 h.

Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El contenido de pigmentos fotosintéticos se determinó mediante el método descrito por Wellburn (1994), con ligeras modificaciones. Brevemente, se mezclaron 15 mg de tejido de lechuga con 1.250 mL de metanol. La mezcla se incubó a temperatura ambiente ($20 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$) en la oscuridad por 24 h y se evaluó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro Uv-Vis (Genesis 10s Uv-Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 666, 653 y 470 nm. La concentración de los pigmentos se expresó en miligramos por gramo de peso fresco (mg g^{-1} PF), usando las siguientes fórmulas:

$$\text{Chl } a = [15.65(A_{666}) - 7.34(A_{653})]$$

$$\text{Chl } b = [27.05(A_{653}) - 11.21(A_{666})]$$

$$\text{Carotenoides} = [(0.00470) - 2.86(\text{Chl } a) - 129.2(\text{Chl } b)]$$

221

Cuantificación de proteínas totales

El contenido de proteínas se determinó mediante la técnica espectrofotométrica de Bradford (1976). Se mezclaron en vórtex (20 s) 100 mg de tejido y 2 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7 - 7.2). Las muestras se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron a 10000 x g a 4 °C durante 10 min. En un tubo de ensayo se colocaron 0.1 mL del sobrenadante y 1 mL del reactivo Bradford. La mezcla se dejó en reposo por 5 min y se evaluó su absorbancia a 595 nm. Los datos se reportaron en miligramos por gramo de peso fresco (mg g⁻¹ PF).

Cuantificación de aminoácidos

La evaluación del contenido de aminoácidos se llevó a cabo mediante el método de Yemm y Cocking (1955). Los aminoácidos fueron extraídos mezclando 100 mg de tejido con 2 mL de buffer de citratos 0.09 M (pH 5). La mezcla se agitó mediante un vórtex durante 20 s, se sonicó por 10 min, se centrifugó a 8000 x g a 4 °C por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron en tubos de ensayo 0.250 mL del sobrenadante, 2.25 mL de buffer de citratos y 0.5 mL de ninhidrina al 0.35 %. La mezcla se agitó y se colocó en baño María en un rango de temperatura de 80 a 100 °C durante 20 min. Terminada la reacción, las muestras se colocaron en un baño de hielo y se procedió a determinar su absorbancia a 570 nm. Los resultados fueron reportados en miligramos por gramo de peso fresco (mg g⁻¹ PF).

Cuantificación de glutatión reducido

Este metabolito se extrajo de las hojas de lechuga siguiendo el método anteriormente descrito para la extracción de proteínas. El contenido de glutatión reducido se determinó mediante la metodología descrita por Xue *et al.* (2001). Brevemente, en tubos de ensayo se agregaron 0.48 mL del sobrenadante, 2.2 mL de Na₂HPO₄ 0.32 M y 0.32 mL de una solución 1 mM del colorante 5,5 ditio-bis-2 nitro benzoico. La reacción se dejó reposar por 15 min y se determinó su absorbancia a 412 nm. Los datos se reportaron en miligramos por gramo de peso fresco (mg g⁻¹ PF).

Determinación de capacidad antioxidante hidrofílica

Se obtuvo un extracto de compuestos antioxidantes utilizando el método descrito anteriormente para la extracción de proteínas y glutatión reducido. La capacidad antioxidante (ABTS) del extracto fue evaluada mediante el método de Re *et al.* (1999). El radical se obtuvo a partir de la reacción del ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM (1:1 v/v) en la oscuridad durante 16 h. Posteriormente, la solución del radical se diluyó con etanol al 20 % hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.01 a 754 nm. En un tubo de 2 mL se colocaron 20 µL del sobrenadante y 980 µL de la dilución del radical ABTS. La mezcla se agitó durante 5 s y se dejó reposar 7 min en oscuridad. La absorbancia del extracto se determinó a 754 nm. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de peso fresco (mg EAA g⁻¹ PF).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y prueba de medias LSD de Fisher ($p \leq 0.05$). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el software Infostat (v2020).

RESULTADOS

Producción de biomasa y rendimiento

Los resultados indicaron que las diferentes CE de la SN causaron cambios significativos ($p \leq 0.05$) en biomasa fresca y seca del cultivo de lechuga (Figura 2). La CE de la SN que mejores resultados presentó tanto en biomasa fresca y seca fue la de 2.5 dS m⁻¹. Dicho tratamiento aumentó el peso fresco de la cabeza (rendimiento), peso fresco de la raíz y peso fresco total en un 144.91, 647.5 y 164.63 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento que presentó los valores más bajos, que fue el que incluyó la SN con CE de 1 dS m⁻¹. El peso seco de la cabeza, peso seco de la raíz y peso seco total aumentaron en un 144.9, 301.83 y 167.04 %, respectivamente, en comparación al tratamiento con la SN de 1 dS m⁻¹, que fue el que causó el contenido más bajo de biomasa seca. En general, se observó que la biomasa incrementó con la CE de la SN de 2.5 dS m⁻¹, para posteriormente disminuir.

Pigmentos fotosintéticos

Las diferentes SNs provocaron cambios significativos ($p \leq 0.05$) en la concentración de pigmentos en lechuga (Figura 3). Conforme aumentó la CE de las SNs, la concentración de los pigmentos fue mayor, siendo la SN de CE de 3 dS m⁻¹ la que provocó la mayor concentración de estos compuestos. Esta SN aumentó el contenido de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total y carotenoides en un 126.78, 122.72, 117.72 y 46.15 % respectivamente, en comparación con la SN de CE de 1 dS m⁻¹, la cual causó los valores más bajos en estas variables respuesta.

Compuestos nitrogenados y capacidad antioxidante

Las diferentes SNs causaron cambios importantes ($p \leq 0.05$) en los contenidos de proteínas, aminoácidos, glutatión reducido y valores de capacidad antioxidante en lechuga (Figura 4). El mayor contenido de proteínas y aminoácidos se observó con la SN de CE de 2 dS m⁻¹, superando en un 142.37 y 252 %, respectivamente, las concentraciones de estos compuestos obtenidos en lechuga tratada con la SN de CE de 1 dS m⁻¹, la cual causó los contenidos más bajos de estos compuestos. La CE de 3 dS m⁻¹ causó el mayor contenido de glutatión reducido, el cual fue 19.04 % mayor al observado con las SNs de 1 y 2 dS m⁻¹, las cuales, causaron la concentración más baja de glutatión reducido. La capacidad antioxidante incrementó con la CE de la SN de 3 dS m⁻¹.

DISCUSIÓN

Producción de biomasa y rendimiento

La obtención de altos rendimientos en los cultivos depende de su genética, su fisiología y del ambiente adecuado para su desarrollo en todas sus etapas fenológicas (Xu y Mou, 2015). En la actualidad, la producción de cultivos es

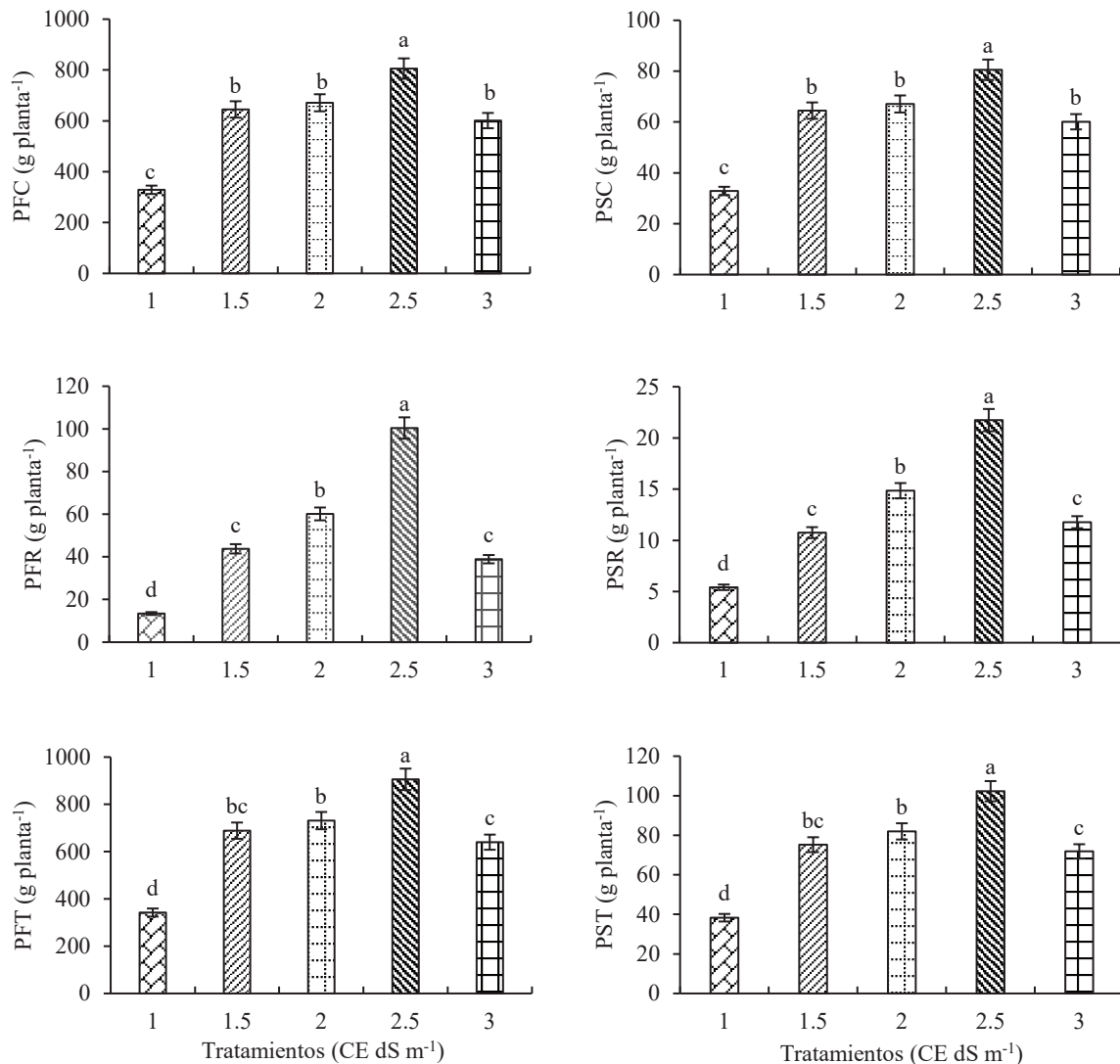


Figura 2. Efecto de la CE de la SN sobre la acumulación de biomasa fresca y seca en el cultivo de lechuga. Promedios conectados mediante letras diferentes son estadísticamente distintos (LSD, $p \leq 0.05$). PFC: Peso fresco de la cabeza; PFR: Peso fresco de la raíz; PFT: Peso fresco total; PSC: Peso seco de la cabeza; PSR: Peso seco de la raíz; PST: Peso seco total. Los intervalos de las barras representan el error porcentual.

Figure 2. Effect of the EC of the NS on the accumulation of fresh and dry biomass in lettuce. Means connected by different letters are statistically different (LSD, $p \leq 0.05$). FHW: Fresh head weight; FRW: Fresh root weight; FTW: Fresh total weight; DHW: Dry head weight; DRW: Dry root weight; DTW: Dry total weight. Bar intervals represent percent error.

afectada por diferentes factores que provocan disminuciones significativas de rendimiento y calidad, lo cual, ha llevado a investigadores a buscar alternativas que permitan mitigar estos problemas sin afectar el medio ambiente (Morales-Espinoza *et al.*, 2019).

En esta investigación, los resultados obtenidos demostraron que el control de la CE de las SNs es un factor determinante en la calidad de la lechuga, aunque dichos resultados dependieron probablemente de las características genéticas de la lechuga romana utilizada (Paris Island Cos), la cual, es una variedad con buena tolerancia a la salinidad, calor y a diferentes enfermedades (Xu y Mou, 2015). Esta buena tolerancia a la salinidad de la variedad de lechuga utilizada causó que la mayor acumulación de biomasa y rendimiento del cultivo fueran obtenidos con la SN de la CE de 2.5 dS m⁻¹.

Las SNs de CE baja (1, 1.5 y 2 dS m⁻¹) causaron una menor acumulación de biomasa, probablemente debido a un déficit de nutrientes, mientras que la SN con la mayor CE (3 dS m⁻¹) pudo causar una restricción en la absorción de agua y nutrientes, provocando así un déficit hídrico, nutricional y un estado de toxicidad por la acumulación de iones en la rizosfera que afectaron negativamente la producción de biomasa (Amalfitano *et al.*, 2017).

La CE tiene una relación importante en la absorción de agua y nutrientes por las plantas, entre más se eleve la CE, la absorción disminuye, ya que las sales son compuestos higroscópicos y tienen la capacidad de retener el agua de su ambiente, motivo por el cual privan a las plantas de estos recursos y por ende disminuyen su rendimiento (Preciado-Rangel *et al.*, 2021).

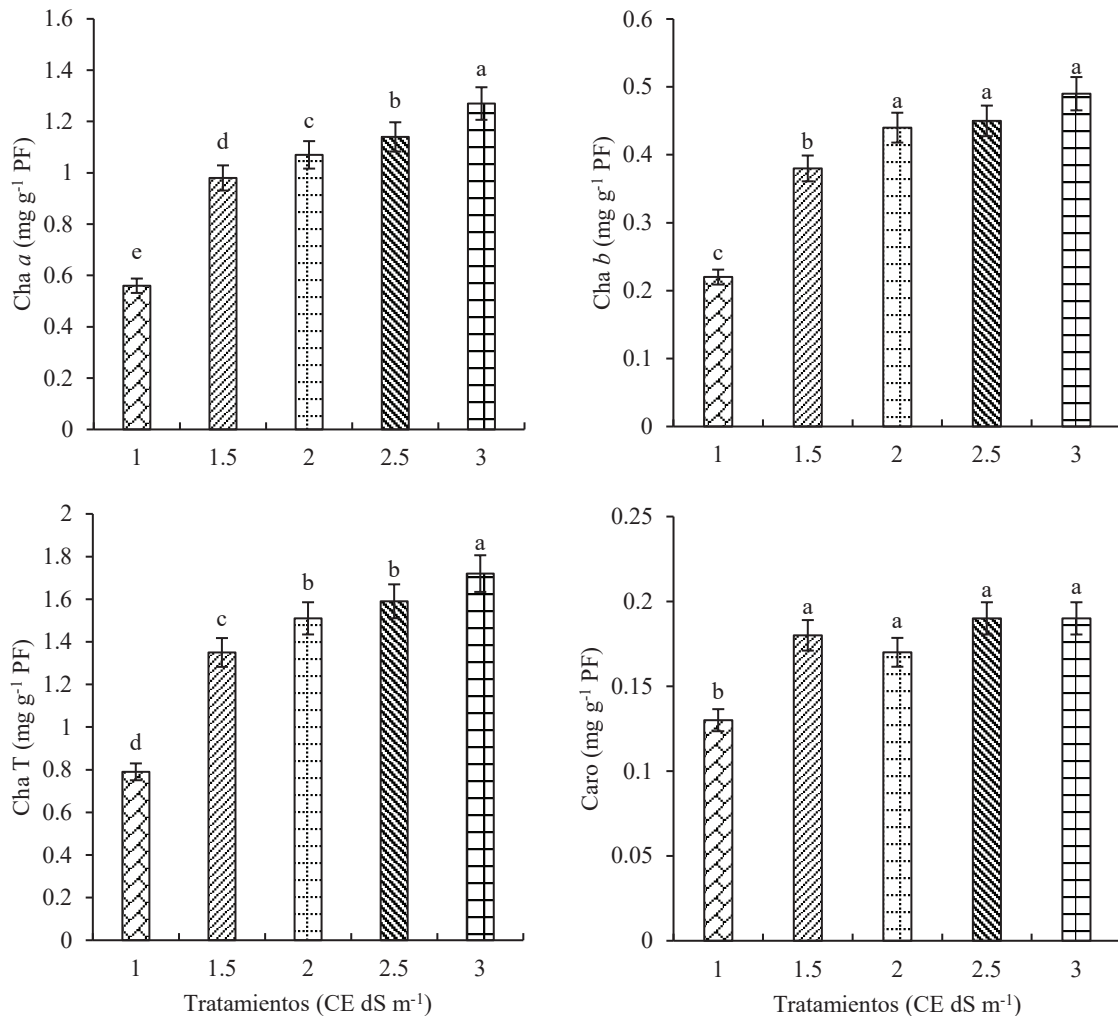


Figura 3. Efecto de la CE de la SN sobre la concentración de pigmentos en el cultivo de lechuga. Promedios conectados mediante letras diferentes son estadísticamente distintos (LSD, $p \leq 0.05$). Cha a: Clorofila a; Cha b: Clorofila b; Cha T: Clorofila total; Carot: Carotenoides; PF: Peso fresco. Los intervalos de las barras representan el error porcentual.

Figure 3. Effect of the EC of the NS on the concentration of pigments in lettuce. Means connected by different letters are statistically different (LSD, $p \leq 0.05$). Cha a: Chlorophyll a; Cha b: Chlorophyll b; Cha T: Total Chlorophyll; Carot: Carotenoids; FW: Fresh weight. Bar intervals represent percent error.

Resultados similares fueron reportados por Alvarado-Camarillo *et al.* (2020), quienes en su estudio con lechuga romana indican que la CE de la SN de 2.5 dS m⁻¹, mejoró la acumulación de biomasa. Aini *et al.* (2020) observaron que la CE de la SN que favoreció en mayor medida la acumulación de biomasa en lechuga romana fue la de 1.4 dS m⁻¹. Por otro lado, da Cunha-Chiamolera *et al.* (2017) evaluaron tres CE de la SN (2, 2.5 y 3 dS m⁻¹) en la producción de lechuga y tomate, y observaron los mejores rendimientos con la SN de CE de 2.5 dS m⁻¹, los cuales fueron inferiores a los mostrados en este estudio.

Pigmentos fotosintéticos

La actividad fotosintética de las plantas está en función de la correcta nutrición y diferentes fenómenos ambientales, por lo cual, es de gran importancia nutrir a los cultivos de forma correcta, de acuerdo con su etapa fenológica y

proporcionarle los cuidados necesarios (Horchani *et al.*, 2010). El proceso fotosintético está relacionado con el contenido de diferentes elementos esenciales, entre ellos nitrógeno (N), potasio (K), magnesio (Mg), fósforo (P), hierro (Fe), entre otros (Yoon *et al.*, 2019). En esta investigación se observó que la concentración de pigmentos incrementó conforme se aumentó la CE de la SN. Se ha sugerido que al incrementar la CE de las SNs se reduce la absorción de agua y nutrientes por la planta, fenómenos que se han asociado con un proceso fotosintético más eficiente (Khoshbakht *et al.*, 2015). Silva *et al.* (2019) también observaron que al incrementar la CE (1, 1.3, 1.6, 1.9 y 2.2 dS m⁻¹) de la SN se incrementó la concentración de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides en lechuga. Morales-Espinoza *et al.* (2019) mencionan que con el incremento de la salinidad se aumenta el contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total en las hojas de tomate.

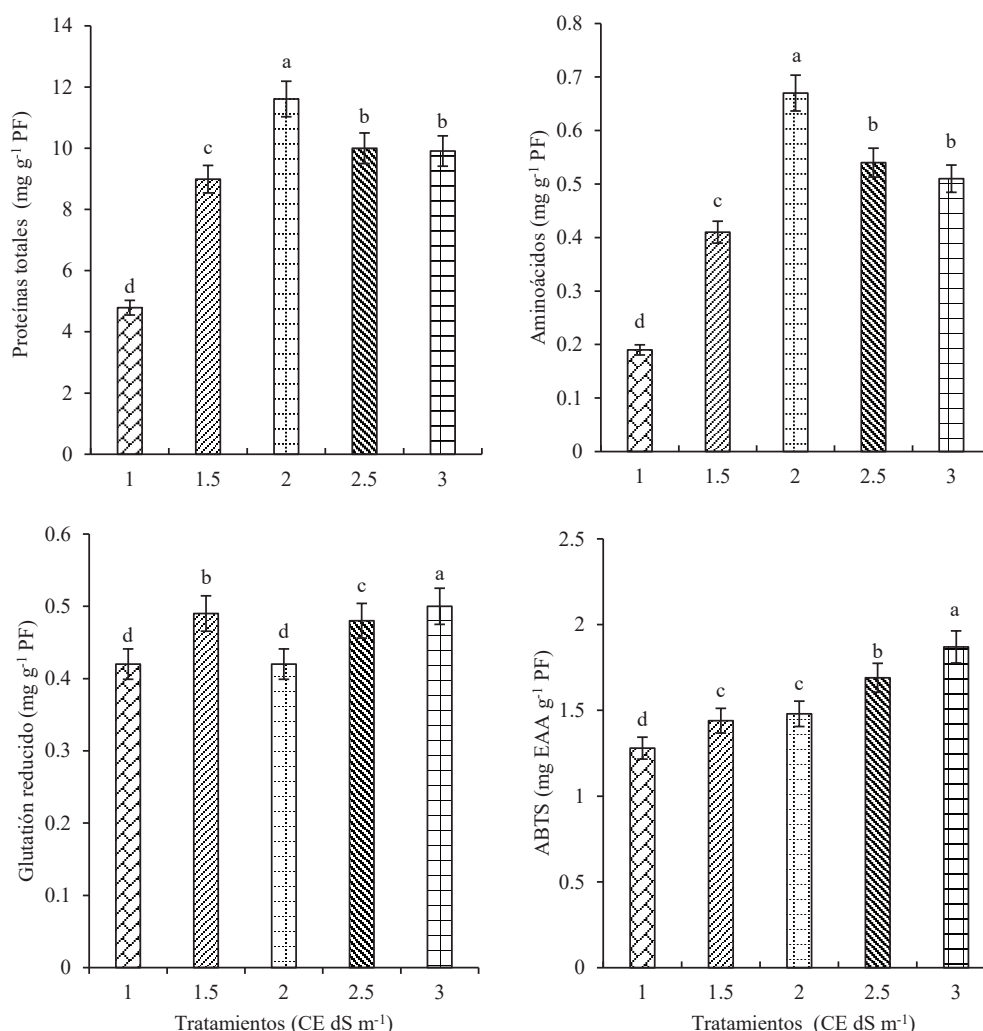


Figura 4. Efecto de la CE de la SN sobre el contenido de proteínas totales, aminoácidos, glutatión reducido y capacidad antioxidante hidrofílica ABTS en el cultivo de lechuga. Promedios conectados mediante letras diferentes son estadísticamente distintos (LSD, $p \leq 0.05$). PF: Peso fresco; ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); EAA: Equivalentes de ácido ascórbico. Los intervalos de las barras representan el error porcentual.

Figure 4. Effect of the EC of the NS on the content of total proteins, amino acids, reduced glutathione and hydrophilic antioxidant capacity ABTS in lettuce. Means connected by different letters are statistically different (LSD, $p \leq 0.05$). FW: Fresh weight; ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); AAE: Ascorbic acid equivalents. Bar intervals represent percent error.

Compuestos nitrogenados y capacidad antioxidante

Los compuestos nitrogenados, como las proteínas, aminoácidos y glutatión, están involucrados en la acumulación de biomasa en los cultivos, sin embargo, también están involucrados en el sistema de defensa de las plantas al tener efectos antioxidantes (Zechmann, 2020). Un antioxidante es considerado cualquier molécula que a muy baja concentración tiene la capacidad de reducir moléculas oxidantes (Liu *et al.*, 2018). En la presente investigación se observó que el contenido de proteínas y aminoácidos se incrementó conforme se elevó la CE de la SN hasta 2 dS m^{-1} , para después disminuir. Sin embargo, en lo que respecta a glutatión reducido y capacidad antioxidante hidrofílica, se observó que los valores de estas variables de respuesta aumentaron gradualmente al incrementar la CE.

Estos resultados sugieren que al incrementar la CE se provocó un aumento en el estrés oxidativo a causa de las sales minerales, que promueve la síntesis de antioxidantes como medida de defensa (Morales-Espinoza *et al.*, 2019; Preciado-Rangel *et al.*, 2021). En este sentido, se puede apreciar que con la CE más alta (3 dS m^{-1}) se estimuló la mayor síntesis de antioxidantes, pero dicha CE afectó negativamente el rendimiento. Ding *et al.* (2018) demostraron que al incrementar la CE de la SN aplicada a *Brassica campestris* ($0 - 9.6 \text{ dS m}^{-1}$) se fortalecía el sistema antioxidante enzimático y no enzimático de la planta. Preciado-Rangel *et al.* (2021) demostraron que al incrementar la CE de la SN ($1.5, 2, 2.5$ y 3 dS m^{-1}) aplicada al cultivo de pimiento morrón se incrementaban los contenidos de ácido ascórbico, fenoles totales, licopeno y β -caroteno, así como la capacidad antioxidante.

CONCLUSIONES

La CE de 2.5 dS m⁻¹ de la SN incrementó la biomasa fresca y seca de la cabeza y raíz del cultivo de lechuga. En cuanto a proteínas y aminoácidos la CE de 2 dS m⁻¹ fue la que mejoró la concentración de estos metabolitos, además la CE de 3 dS m⁻¹ mejoró la concentración de clorofilas, carotenoides, glutatión reducido y capacidad antioxidante hidrofílica ABTS, pero disminuyó el rendimiento. Es importante mencionar que la CE de 1 dS m⁻¹ afectó negativamente todas las variables estudiadas. Estos datos son importantes para el establecimiento de este cultivo en experimentos posteriores, ya que se pueden usar las diferentes conductividades de acuerdo con los objetivos del estudio. Si los objetivos se centran únicamente en mejorar el rendimiento, es recomendable utilizar la CE de 2.5 dS m⁻¹. Sin embargo, como el comportamiento de los compuestos bioquímicos en este experimento es variado, es necesario realizar más estudios que indiquen de forma más precisa la influencia de las SNs en dichos compuestos.

REFERENCIAS

- Adhikari, N.D., Simko, I. y Mou, B. 2019. Phenomic and physiological analysis of salinity effects on lettuce. *Sensors*. 19: 4814. <https://doi.org/10.3390/s19214814>
- Aini, N., Yamika, W. S.D. y Ulum, B. 2020. Effect of nutrient concentration, PGPR and AMF on plant growth, yield and nutrient uptake of hydroponic lettuce. *International Journal of Agriculture & Biology*. 21: 175-183. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0879>
- Alvarado-Camarillo, D., Valdez-Aguilar, L.A., González-Fuentes, J.A., Rascón-Alvarado, E. y Peña-Ramos, F.M. 2020. Response of hydroponic lettuce to aeration, nitrate and potassium in the nutrient solution. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*. 70: 341-348. <https://doi.org/10.1080/09064710.2020.1730430>
- Amalfitano, C., Del Vacchio, L., Somma, S., Cuciniello, A. y Caruso, G. 2017. Effects of cultural cycle and nutrient solution electrical conductivity on plant growth, yield and fruit quality of 'Friariello' pepper grown in hydroponics. *Horticultural Science*. 44: 91-98. <https://doi.org/10.17221/172/2015-HORTSCI>
- Bilal, H.M., Zulfiqar, R., Adnan, M., Umer, M.S., Islam, H., Zaheer, H., Abbas, W. M., Haider, F. y Ahmad, I. 2020. Impact of salinity on citrus production; A review. *International Journal of Applied Research*. 6: 173-176.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- da Cunha-Chiamolera, T.P.L., Urrestarazu, M., Filho, A.B.C. y Morales, I. 2017. Agronomic and Economic Feasibility of Tomato and Lettuce Intercropping in a Soilless System as a Function of the Electrical Conductivity of the Nutrient Solution. *HortScience*. 52: 1195-1200. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12170-17>
- Han, Y., Zhao, C., He, X., Sheng, Y., Ma, T., Sun, Z., Liu, X., Liu, C., Fan, S., Xu, W. y Huang, K. 2018. Purple lettuce (*Lactuca sativa* L.) attenuates metabolic disorders in diet induced obesity. *Journal of Functional Foods*. 45: 462-470. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.027>
- Hassan, M. U., Islam, M.M., Wang, R., Guo, J., Luo, H., Chen, F. y Li, X. 2020. Glutamine application promotes nitrogen and biomass accumulation in the shoot of seedlings of the maize hybrid ZD958. *Planta*. 251: 66. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03363-9>
- Horchani, F., Hajri, R. y Aschi-Smiti, S. 2010. Effect of ammonium or nitrate nutrition on photosynthesis, growth, and nitrogen assimilation in tomato plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 173: 610-617. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000055>
- Jankovska-Bortkevic, E., Gavelien, V., Šveikauskas, V., Mockeviciute, R., Jankauskien, J., Todorova, D., Sergiev, I. y Jurkoniene, S. 2020. Foliar Application of Polyamines Modulates Winter Oilseed Rape Responses to Increasing Cold. *Plants*. 9: 179. <https://doi.org/10.3390/plants9020179>
- Khoshbakht, D., Ramin, A.A. y Baninasab, B. 2015. Effects of sodium chloride stress on gas exchange, chlorophyll content and nutrient concentrations of nine citrus rootstocks. *Photosynthetica*. 53: 241-249. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0098-1>
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.C., Kandaswamy, E., Zhou, T. y Zou, L. 2018. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in Physiology*. 9: 477. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00477>
- Manos, D.P. y Xydis, G. 2019. Hydroponics: Are we moving towards that direction only because of the environment? a discussion on forecasting and a systems review. *Environmental Science and Pollution Research*. 26: 12662-12672. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04933-5>
- Michelon, N., Pennisi, G., Myint, N.O., Orsini, F. y Gianquinto, G. 2021. Optimization of Substrate and Nutrient Solution Strength for Lettuce and Chinese Cabbage Seedling Production in the Semi-Arid Environment of Central Myanmar. *Horticulturae*. 7: 64. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7040064>
- Morales-Espinoza, M.C., Cadenas-Pliego, G., Pérez-Alvarez, M., Hernández-Fuentes, A. D., Cabrera de la Fuente, M., Benavides-Mendoza, A., Valdés-Reyna, J. y Juárez-Maldonado, A. 2019. Se Nanoparticles Induce Changes in the Growth, Antioxidant Responses, and Fruit Quality of Tomato Developed under NaCl Stress. *Molecules*. 24: 3030. <https://doi.org/10.3390/molecules24173030>
- Preciado-Rangel, P., Rueda-Puente, E.O., Valdez-Aguilar, L.A., Reyes-Pérez, J.J., Gallegos-Robles, M.Á. y Murillo-Amador, B. 2021. Conductividad eléctrica de la solución nutritiva y su efecto en compuestos bioactivos y rendimiento de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 24: 52.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26: 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Sambo, P., Nicoletto, C., Giro, A., Pii, Y., Valentinuzzi, F., Mimmo, T., Lugli, P., Orzes, G., Mazzetto, F., Astolfi, S., Terzano, R. y Cesco, S. 2019. Hydroponic Solutions for Soilless Production Systems: Issues and Opportunities in a Smart Agriculture Perspective. *Frontiers in Plant Science*. 10: 923. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00923>
- Shinde, C.T. y Marathe, P.S. 2021. Farming Without Soil in Today's Era. *Iconic Research and Engineering Journals*. 4: 24-27.

- Silva, P.F., Matos, R.M., Bonou, S. M., Sobrinho, T.G., Borges, V.E., Dantas Neto, J. y Melo Júnior, A.P. 2019. Yield of the hydroponic lettuce under levels of salinity of the nutrient solution. *African Journal of Agricultural Research*. 14: 686-693. <https://doi.org/10.5897/AJAR2018.13782>
- Simko, I., Hayes, R.J., Mou, B. y McCreight, J.D. 2014. Lettuce and Spinach. In: *Yield Gains in Major U.S. Field Crops*. S. Smith., B. Diers., J Specht. y B. Carver. (ed.), pp. 53-86. CSSA Special Publication; American Society of Agronomy; Inc.: Madison; WI; USA; Crop Science Society of America; Inc.: Fitchburg; WI; USA; Soil Science Society of America; Inc.: Madison; WI; USA. <https://doi.org/10.2135/cssaspecpub33>
- Steiner, A.A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*. 15: 134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Wellburn, A.R. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*. 144: 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Xu, C. y Mou, B. 2015. Evaluation of Lettuce Genotypes for Salinity Tolerance. *HortScience*. 50: 1441-1446. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.10.1441>
- Xue, T., Hartikainen, H. y Piironen, V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*. 237: 55-61. <https://doi.org/10.1023/A:1013369804867>
- Yemm, E.W. y Cocking, E.C. 1955. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*. 80: 209-214. <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>
- Yoon, H., Kang, Y.G. y Chang, Yoon SeokKim, J.H. 2019. Effects of Zerovalent Iron Nanoparticles on Photosynthesis and Biochemical Adaptation of Soil-Grown *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials*. 9: 1543. <https://doi.org/10.3390/nano9111543>
- Zechmann, B. 2020. Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress. *Plants*: 9: 1067. <https://doi.org/10.3390/plants9091067>



Efecto de inoculantes microbianos en los compuestos bioactivos y actividad antioxidante del chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.)

Effect of microbial inoculants on bioactive compounds and antioxidant activity of xcat'ik pepper (*Capsicum annuum* L.)

Mario Sánchez¹, Ruíz-Sánchez E²; Muñoz-Rodríguez D³; Chan Cupul W⁴; Medina-Dzul K^{2*}

¹ Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. Alianza Norte 202, PIIT, Carretera Monterrey-Aeropuerto Km. 10, Apodaca NL, 66628. México.

² Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Conkal. Av. Tecnológico S/N, Conkal, Yucatán. México, 97345.

³ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte km. 33.5, Tablaje catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn, 97203, Mérida, Yucatán, México.

⁴ Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Km. 40, Autopista Colima-Manzanillo, 28100, Tecomán, Colima, México.

RESUMEN

El chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.), originario de la península de Yucatán tiene propiedades organolépticas únicas. Pero, la calidad nutracéutica ha sido poco explorada y solamente escasos estudios han buscado mejorar el rendimiento productivo de la planta. La especie *Capsicum* es considerada un alimento importante debido al contenido de compuestos bioactivos, que promueven efectos beneficiosos a la salud. El uso de inoculantes microbianos son una alternativa para incrementar su rendimiento, mejorar la calidad de los frutos y disminuir el uso de los fertilizantes químicos. En este trabajo se evaluó el efecto de un consorcio microbiano, así como de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* sobre los contenidos de ácido ascórbico, fenoles totales, flavonoides, clorofilas, carotenoides, capacidad antioxidante y capsaicinoides, en el fruto del chile xcat'ik. Los resultados fueron comparados con un control sin inocular. Las inoculaciones con *T. harzianum* y con *B. subtilis* incrementaron el contenido de carotenoides, así como la actividad antioxidante por ABTS⁺, mientras el consorcio microbiano incrementó la actividad antioxidante por DPPH[•]. De acuerdo a nuestros resultados, los inoculantes evaluados podrían sustituir a los fertilizantes químicos, debido a que igualan o mejoran la calidad nutracéutica del fruto del chile xcat'ik, con la ventaja de un menor daño al medio ambiente.

Palabras clave: actividad antioxidante, carotenoides, *Capsicum annuum*, inoculantes microbianos, agricultura sustentable.

ABSTRACT

Xcat'ik pepper (*Capsicum annuum* L.), native to the Yucatan Peninsula, has unique organoleptic properties. However, the nutraceutical quality of the fruit has been scarcely explored and only a few previous studies have focused on improving the productive yield of the plant, hence the importance of generating knowledge in this field. The *Capsicum* species is considered an important food due to the bioactive compounds content, which promote beneficial

health effects. The use of microbial inoculants is an alternative to increase yield, improve fruit quality, and reduce the use of chemical fertilizers. In this work, the effect of a microbial consortium, as well as *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* on the contents of ascorbic acid, total phenols, flavonoids, chlorophylls, carotenoids, antioxidant capacity and capsaicinoids in the fruit of xcat'ik pepper was evaluated. The obtained results were compared with an uninoculated control. Inoculations with *T. harzianum* and *B. subtilis* increased carotenoid content as well as antioxidant activity by ABTS⁺, in contrast the microbial consortium increased antioxidant activity by DPPH[•]. According to our results, the evaluated inoculants could replace chemical fertilizers, because they equal or even improve the nutraceutical quality of the x'catik pepper fruit, with the advantage of being less harmful to the environment.

Keywords: antioxidant activity, carotenoids, *Capsicum annuum*, microbial inoculants, sustainable agriculture.

INTRODUCCIÓN

El chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.) representa uno de los principales cultivos de importancia económica en la península de Yucatán, es de carne abundante y sabrosa, moderadamente picante lo que le confiere un sabor agradable. Debido a esto tiene gran aceptación y demanda en el mercado y también puede ser materia prima para la elaboración de productos industriales (Cisneros-Pineda, 2007). Después de los vegetales, la especie *Capsicum annuum* es la más consumida a nivel mundial, es una excelente fuente de colorantes naturales y compuestos antioxidantes. Es rico en capsaicinoides, compuestos alcaloides farmacéuticamente significativos por su eficacia neurológica, aporta diversos compuestos bioactivos con efectos positivos para la salud ya que se asocian a muchas actividades biológicas con propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, entre otras, por lo que su consumo es ampliamente recomendado en cualquiera de sus variedades (Silva *et al.*, 2014, Karppinen *et al.*, 2016). Por otra parte, la búsqueda de nuevas

*Autor para correspondencia: Kati Medina Dzul
 Correo electrónico: kati.medina@itconkal.edu.mx

Recibido: 4 de marzo de 2022

Aceptado: 19 de junio de 2022

propuestas agrícolas menos agresivas con la salud y el medio ambiente, ha llevado al uso de los inoculantes microbianos como biofertilizantes, microorganismos beneficiosos que pueden ser una vía utilizable para mejorar el crecimiento de las plantas mejorando la competitividad vegetal porque promueven la resistencia contra patógenos y al medio ambiente, además ayudan a reducir el efecto negativo por estrés (Chatterjee et al., 2016; Zhao et al., 2019).

Los niveles de los compuestos bioactivos contenidos en los vegetales pueden variar dependiendo de las prácticas agrícolas adoptadas para el cultivo. En función de esto algunos inoculantes microbianos, son capaces de mejorar las propiedades nutritivas de frutas o vegetales al aumentar la actividad antioxidante, fenoles totales y la clorofila (Khalid et al., 2017), antocianinas, carotenoides y flavonoides (Baslam et al., 2011), la dulzura de los frutos y el contenido de humedad, entre otros factores (Singh y Prabha, 2020).

Si bien, el uso de estos productos tiene muchas ventajas, es importante recordar que su efectividad varía y depende de muchos factores como el tipo de suelo, la humedad del aire o precipitaciones, así como las condiciones de almacenamiento (Pylac et al., 2019).

En este sentido en 2010, Russo y Perkins, realizaron uno de los primeros trabajos de investigación en condiciones de invernadero con el cultivo de pimiento morrón (*C. annuum* L.) utilizando bacterias y hongos micorrízicos (*Glomus* sp.) donde evaluaron el rendimiento y el contenido de nutrientes. Asimismo en 2014, Silva et al. realizaron la inoculación de *C. annuum* (L.) con cepas de *Rizobium strains* para evaluar su efecto en los compuestos antioxidantes. En 2020, Cisternas-Jamet et al. emplearon con éxito el género *Bacillus* para el cultivo de chile y tomate. Debido a los resultados satisfactorios obtenidos con inoculantes microbianos sobre el género *Capsicum* reportados en estudios previos, la importancia económica que representa el cultivo del chile xcat'ik y el nulo conocimiento sobre los compuestos bioactivos del mismo, se planteó el objetivo de evaluar el efecto de los inoculantes microbianos en los cambios de los compuestos bioactivos, actividad antioxidante y capsaicinoides de los frutos del chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.) cultivados en la península de Yucatán para generar información acerca de sus beneficios o propiedades como alimento nutracéutico que pueda contribuir a un efecto positivo en la salud humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y preparación del área experimental

El experimento se realizó en un invernadero tipo túnel en el área de investigación hortícola del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, al noreste de Mérida, ubicado en 21° 06' latitud Norte y 89° 31' longitud Oeste y con una altitud de 10 msnm. La región se caracteriza por tener un clima cálido, el más seco de los subhúmedos con lluvias uniformemente repartidas y o tendencia al verano, alto porcentaje de lluvia invernal y sequía intraestival ($Ax'(w_o)w''$) de acuerdo a la clasificación climática de Köppen. La temperatura media anual es de 26.6 °C y las mínimas de 17 °C, con una precipitación

media anual de 600 mm. El material genético utilizado fue chile xcat'ik criollo Itck01. La plantación se estableció en líneas de 38 m de largo y 1.2 m de separación entre ellas, las líneas contenían camas de 30 cm de ancho, las cuales fueron abonadas con 2 kg de composta por metro lineal de cama de siembra. Las plantas se establecieron en las camas a una distancia de 0.3 m entre ellas. Se utilizó un sistema de riego por goteo con gasto nominal de 1 L h⁻¹. La fertilización (kg ha⁻¹) con N: P: K fue en proporción 200:150:180 para el ciclo de 180 días de chile xcat'ik.

Tabla 1. Fertilización en kg por etapa fenológica de chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.) tomando como base la densidad de 20 000 plantas ha⁻¹.

Table 1. Fertilization in kg per phenological stage of xcat'ik pepper (*Capsicum annuum* L.) based on a density of 20 000 plants ha⁻¹.

Etapa fenológica	Días después del trasplante	Cantidad de fertilizante		
		N	P	K
Adaptación	1-15	37.5	22.5	30.5
Crecimiento	16-34	75.5	30.5	44
Floración	36-60	42	60.5	50.5
Cosecha	61-160	45	36.5	55

Diseño experimental y descripción de tratamientos

Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento. Las parcelas que representaron las repeticiones contenían 30 plantas.

Se aplicaron cuatro tratamientos: 1) Consorcio de microorganismos *Glomus* spp. + *Bacillus megaterium* + *Pseudomonas fluorescens* + *Azospirillum brasilense* + *Azotobacter chroococcum*; 2) *Bacillus subtilis*, 3) *Trichoderma harzianum* y 4) control (tratamiento sin inoculante). Las aplicaciones se realizaron con una bomba de mochila de 20 L, directo a la base de la planta, a los días 7, 14, 21 y 28. La concentración de inóculo en los productos comerciales y las cantidades de producto comercial en cada aplicación se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Inoculantes microbianos aplicados en el cultivo de chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.).

Table 2. Microbial inoculants applied in xcat'ik pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivation.

Tratamiento	Ingrediente activo	Concentración de inóculo en producto comercial	Dosis por planta en cada aplicación
Consorcio microbiano	Pro micorriza* (<i>Glomus</i> spp.)	33 inóculos g ⁻¹	0.1 g
	Bacterias benéficas (<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> .)	5x10 ⁸ ufc mL ⁻¹	
<i>B. subtilis</i>	Bactilis* (<i>Bacillus subtilis</i>)	1x10 ¹² ufc mL ⁻¹	0.1 mL
<i>T. harzianum</i>	Trico-bio* (<i>Trichoderma harzianum</i>)	1x10 ¹¹ ufc mL ⁻¹	0.1 mL
Control	Sin inoculante	-	-

Colecta de material

Para el análisis nutraceutico del fruto se muestrearon aleatoriamente las plantas inoculadas hasta obtener un kg de fruto en total, las muestras fueron parte del tercer corte. Después del muestreo los frutos se lavaron, se congelaron y posteriormente se liofilizaron, en seguida se mantuvieron en congelación hasta su análisis.

Determinación y cuantificación de los compuestos bioactivos, actividad antioxidante y capsaicinoides**Cuantificación de ácido ascórbico**

El contenido de ácido ascórbico fue cuantificado de acuerdo al método de Dürüst *et al.* (1997). Los extractos se obtuvieron con 0.3 g de muestra en 10 mL de ácido oxálico (0.4 % p/v), la mezcla se sónico durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se filtró.

Se mezcló 1 mL de de ácido oxálico, 1 mL del buffer de acetato (pH 3.5) y 8 mL de 2,6-dicloroindofenol (DCIP). Posteriormente, la absorbancia se midió a 520 nm a los 15 s, (L1) para todas las mediciones en un espectrofotómetro GCB, CINTRA 1010, UV-visible (Australia). El espectrofotómetro se reajustó a cero mezclando: 1 mL de ácido ascórbico (diferentes concentraciones o extracto de muestra), 1 mL de buffer de acetato y 8 mL de agua desionizada. Posteriormente, se determinó la absorbancia colocando: 1 mL del estándar o muestra de, 1 mL de buffer de acetato y 8 mL de DCIP (L2).

L1 y L2 fueron las absorbancias de cada concentración con las que se realizó la curva de calibración (10, 20, 30, 40 y 50 mg L⁻¹). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido ascórbico (EA) por cada 100 g de muestra peso seco (mg EA 100 g⁻¹ p.s).

Determinación de fenoles totales

Los compuestos fenólicos fueron determinados utilizando el método de Folin-Ciocalteu reportado por (Singleton y Rossi, 1965). Las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro GCB, CINTRA 1010, UV-visible (Australia), a una longitud de onda de 765 nm. La concentración de fenoles se calculó a partir de una curva estándar preparada a base de ácido gálico a concentraciones de 25, 50, 75, 100 150 y 200 mg L⁻¹. El contenido total de fenoles en el extracto se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso seco de la muestra (mg EAG 100 g⁻¹ p.s).

Determinación de flavonoides

Se realizó de acuerdo a Chang *et al.* (2002), donde las absorbancias se midieron a 415 nm. La concentración de flavonoides se calculó a partir de una curva estándar preparada a base de quercetina con 6 concentraciones de 10 a 300 mg L⁻¹. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados en equivalentes de quercetina por 100 g de peso seco de la muestra (mg EQ 100 g⁻¹ p.s).

Determinación de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides)

Se realizó de acuerdo al método de Soltani *et al.* (2019)

las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro GCB, CINTRA 1010, UV-visible (Australia), a 663 y 645 nm para determinar clorofila a (Ca) y b (Cb) y 470 nm para determinar carotenoides (Cc). Los cálculos fueron obtenidos con la ayuda de las siguientes ecuaciones, los resultados se expresaron en mg por 100 g de fruto en peso seco.

$$\begin{aligned} Ca &= 12.21 A_{665} - 2.81 A_{649} \\ Cb &= 20.13 A_{649} - 5.03 A_{665} \\ Cc &= \frac{1000A_{470} - 3.27 Ca - 104 Cb}{245} \end{aligned}$$

Determinación de la capacidad antioxidante**Obtención del extracto para la cuantificación de la actividad antioxidante**

A 0.5 g del material liofilizado se le agregaron 5 mL de MeOH acuoso al 80 % (v/v), la mezcla se sometió a sonicación durante 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se separó y se adicionaron 5 mL de MeOH al 80%, nuevamente la mezcla se sometió a sonicación durante 20 min más. Los dos extractos se mezclaron y la mezcla se mantuvo en refrigeración, hasta su análisis.

Capacidad antioxidante por el método del radical ABTS^{•+}

Se realizó de acuerdo Re *et al.* (1999), las absorbancias se midieron a 734 nm. La actividad antioxidante se cuantificó a través de una curva estándar a base de trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) de 6 puntos con concentraciones de 10 a 90 mg L⁻¹. Los resultados se expresan en mg equivalente a trolox por cada 100 g de fruto liofilizado (mg ET 100 g⁻¹ p.s).

Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH[•]

Se empleó el método propuesto por Kim *et al.* (2004), se preparó una solución del radical DPPH[•] a una concentración de 100 µM en metanol al 80 %. La reacción se llevó a cabo tomando 0.1 mL de muestra + 3.9 mL de la solución de DPPH[•], la mezcla se homogenizó en un vortex a temperatura ambiente, se mantuvo en oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm después de 30 y 60 min. La concentración de DPPH[•] en el medio de reacción se calculó a partir de una curva de calibración elaborada con el antioxidante sintético trolox a concentraciones de 0.08-1.28 mM y a los 30 min y a los 60 min. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de Trolox por 100 g de fruto liofilizado (mg ET 100 g⁻¹ p.s).

Cuantificación de capsaicinoides

Para extraer los capsaicinoides (capsaicina y dihidro-capsaicina), se utilizó el método de Collins *et al.* (1995). La identificación de capsaicina y dihidrocapsaicina se realizó con un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) marca Perkin Elmer serie 200, con detector de UV Flexar (Waltham, Massachusetts). Se utilizó una columna de fase reversa Hypersil gold, C18, 50 x 2.1mm y con tamaño de partícula de 1.9 µm. Las condiciones de operación del HPLC incluyeron temperatura ambiente, velocidad de flujo de la fase móvil 1 mL min⁻¹, la duración de la corrida fue de 12 min.

La fase móvil fue a gradiente isocrático que consistió en 25% del disolvente A (agua 100%) y 75% del disolvente B (acetoni-trilo 100%), se inyectaron 20 μL y se registró la absorbancia a una longitud de onda de 281 nm.

Análisis estadístico

Los resultados se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias por el método LSD, con el software estadístico Statgraphics XVII-X64 para evaluar si existen diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0.05$) entre los inoculantes microbianos y el control. Las variables de respuesta evaluadas fueron: ácido ascórbico, fenoles totales, flavonoides, carotenoides, clorofilas a, b y total, actividad antioxidante, capsaicina y dihidrocapsaicina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos bioactivos

Cuantificación de ácido ascórbico

La biofertilización con inoculantes microbianos produjo diversos efectos sobre los compuestos bioactivos, en el fruto de chile xcat'ik (Tabla 3). En el caso del ácido ascórbico se observó que *T. harzianum* y el consorcio microbiano fueron iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$) al control, en contraste con los frutos de las plantas inoculadas con *B. subtilis* que mostraron un ligero decremento de este metabolito secundario. Al respecto, Esitken *et al.* (2010) reportaron resultados similares a los nuestros con la inoculación de fresas inoculadas con *pseudomonas* BA-8, *bacillus* OSU-142 y *bacillus* M-3 individualmente o en combinación en donde el contenido de ácido ascórbico fue igual al control; en contraste Cisternas-Jamet *et al.* (2020) obtuvieron incrementos significativos de ácido ascórbico para pimiento verde inoculando tres veces con *Bacillus amyloliquefaciens* en el semillero. Las diferencias con este estudio, aparentemente se deben al mecanismo de interacción de los inoculantes en los pasos de inoculación o el proceso de inoculación, en nuestro estudio la inoculación fue efectuada después del trasplante directamente en la base de la planta una vez cada siete días. Otro aspecto importante a considerar es el efecto que un determinado microorganismo tiene sobre una planta, este efecto puede cambiar dependiendo de las condiciones ambientales, así

Tabla 3. Efecto de agentes inoculantes microbianos sobre el contenido de ácido ascórbico, fenoles y flavonoides en el fruto de chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.).

Table 3. Effect of microbial inoculant agents on xcat'ik pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) ascorbic acid, phenols and flavonoids content.

Tratamiento	Ácido ascórbico (g.100g ⁻¹)	Fenoles (mg.100g ⁻¹)	Flavonoides (mg.100g ⁻¹)
Control	27.48 \pm 2.06 ^a	445.61 \pm 5.68 ^a	51.76 \pm 4.43 ^a
<i>B. subtilis</i>	22.83 \pm 1.13 ^b	414.21 \pm 18.77 ^a	48.48 \pm 10.21 ^{ba}
<i>T. harzianum</i>	29.83 \pm 2.10 ^a	417.40 \pm 15.04 ^a	37.88 \pm 3.77 ^{bc}
Consortio microbiano	29.76 \pm 1.52 ^a	408.12 \pm 4.80 ^a	30.78 \pm 2.23 ^c

n=3, medias (\pm D.E) ^{abc} diferentes letras en una misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$; LSD).

como de otros parámetros. Los microorganismos pueden afectar a las plantas de forma beneficiosa, dañina o neutra dependiendo del tipo de interacción debido a que los órganos de la planta interactúan con estos microorganismos a lo largo del desarrollo fenológico, formando complejos ensamblajes microbianos (Ogata-Gutiérrez, Zúñiga-Dávila, 2020). El comportamiento de la síntesis del ácido ascórbico con la interacción de los inoculantes microbianos puede producir variación entre resultados y es posible atribuir los cambios a diversos factores. Se ha demostrado que las vías metabólicas de este componente responden a estímulos ambientales como las alteraciones en la densidad de luz, la temperatura, un bajo nivel de oxígeno y algunas heridas que pudiera tener la planta, adicionalmente otro aspecto importante a evaluar en el chile xcat'ik, sería el contenido de azúcares, debido a que la biosíntesis del ácido ascórbico y la ruta dominante para su acumulación es a partir de la glucosa a través de la vía llamada L-galactosa (Wheeler *et al.*, 2015). Asimismo, existen estudios que sustentan que las interacciones hormonales, así como la síntesis de etileno también influyen en la acumulación de este metabolito (Mellidou y Kanellis, 2017). La nula respuesta de los inoculantes microbianos sobre el incremento de ácido ascórbico en el fruto de chile xcat'ik, posiblemente se debe a que los inoculantes microbianos no fueron lo suficientemente capaces de movilizar a las moléculas o de facilitar los mecanismos que inician la biosíntesis de ácido ascórbico. Sin embargo, por los resultados obtenidos en este estudio, el uso de *T. harzianum* y el consorcio microbiano podría presentar varias ventajas en contraste con los fertilizantes químicos, tales como la disminución de costos para la producción del cultivo (Grageda-Cabrales *et al.*, 2012). No existe el riesgo de acumulación de compuestos tóxicos provenientes de los fertilizantes químicos en plantas o frutos, lo que podría disminuir enfermedades de quién los consume a largo plazo, además de que son inocuos para el medio ambiente.

Determinación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son el grupo más grande de compuestos antioxidantes por lo que resulta interesante su estudio, son sintetizados cuando la planta los necesita porque juegan un papel importante en su adaptación al ecosistema (Rodríguez *et al.*, 2019). El género *Capsicum* es una fuente rica de estos compuestos bioactivos. Sin embargo, los resultados evidenciaron que no existieron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos y el control.

Resultados similares fueron reportados por Lombardi *et al.* (2020), quienes no observaron una respuesta positiva en el incremento de fenoles con la inoculación en plantas de fresa. Por el contrario, Pascale *et al.* (2017), señalaron que la inoculación con *T. harzianum* en uvas incrementó la cantidad de los compuestos fenólicos. En este sentido, Roupheal *et al.* (2017) sugieren que la biosíntesis de estos metabolitos responde al estrés provocado por las bajas temperaturas al comparar dos temporadas de cultivo de alcachofas bioferti-

zadas con consorcios de micorrizas arbusculares (*Rizoglyphus intraradices*, *Funneliformis mosseae* y *Trichoderma atroviride*). Observaron un incremento de los compuestos fenólicos en la temporada donde predominaron las bajas temperaturas. En nuestro caso, las altas temperaturas (30 - 40 °C) prevalecieron en la región durante el desarrollo de este estudio, pero no se puede asumir que los fenoles fueron afectados por la temperatura, ya que las diferencias entre los resultados pudieron deberse a diversos factores, como la genética de la planta, las dosis aplicadas de los inoculantes, las técnicas utilizadas, el ambiente, la bioquímica de las interacciones entre otros (Calvo *et al.*, 2014). La reacción clave que vincula el metabolismo fenólico primario con el secundario es la enzima L-fenil alanina amonio liasa, pero la expresión de los genes de esta enzima está controlada por el estado de desarrollo, el tipo de célula y una amplia variedad de factores ambientales (Salveit, 2017). Debido a la complejidad de las vías de biosíntesis de los compuestos fenólicos y sus numerosas interconexiones, hace más difícil comprender estos procesos (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020).

Determinación de flavonoides

Otro de los principales grupos de metabolitos secundarios de las plantas son los flavonoides. Su estructura polifenólica tiene diversos efectos bioquímicos y antioxidantes favorables, asociados a la prevención de diversas enfermedades crónico-degenerativas (Panche *et al.*, 2016). En nuestro estudio se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), para los contenidos de flavonoides, observándose similitud entre el control y *B. subtilis*, y un decremento con los tratamientos de *T. harzianum* y el consorcio microbiano. En contraste Chandrasekaran *et al.* (2019) reportaron un incremento significativo en el contenido de flavonoides en frutos de tomate inoculados con *B. subtilis*.

Una posible explicación, es la poca capacidad de los inoculantes para intervenir en la síntesis de las enzimas peroxidasa y polifenoloxidasas encargadas de la producción de los flavonoides, además de interferencias que pudieron surgir entre las interacciones del metabolismo de la planta y los inoculantes microbianos. Adicionalmente, la escasa movilidad y disponibilidad de nitrógeno, mineral que está relacionado con el aminoácido fenilalanina, precursor importante para la síntesis de estos metabolitos secundarios (Ortega-García *et al.*, 2015).

En el caso de *T. harzianum*, aunque se ha demostrado que exhibe una gran capacidad para movilizar y absorber nutrientes del suelo, su uso implica la coordinación de numerosas estrategias como la competencia por nutrientes que se considera la más importante y su uso eficaz depende de su capacidad para conseguir energía derivado del metabolismo de carbohidratos (Sood *et al.*, 2020).

Los flavonoides forman parte del grupo de los fenoles que son biosintetizados a partir de carbohidratos, en este sentido se ha informado que algunas cepas de *T. harzianum* codifican un transportador de glucosa que expresa una alta afinidad, aún a concentraciones excepcionalmente bajas

(Benitez *et al.*, 2004). Probablemente *T. harzianum* utiliza este recurso para otros procesos donde los carbohidratos son demandados, lo que finalmente podría hacer que no estén disponibles para la biosíntesis de los flavonoides y de ahí los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El proceso exacto o vías de síntesis que ocurren en las plantas son complejos, algunos compuestos bioactivos se ven favorecidos y otros podrían ser rezagados dependiendo de la competencia metabólica que se den entre las cepas de los inoculantes y las plantas (Ramos-Solano *et al.*, 2014).

Determinación de pigmentos fotosintéticos Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos que le confieren color a los frutos y tienen propiedades antioxidantes. Los frutos inoculados con *B. subtilis* and *T. harzianum*, mostraron un efecto positivo en el nivel de carotenoides, estos inoculantes microbianos fueron iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$) entre sí, pero diferentes al consorcio microbiano que fue estadísticamente ($P \leq 0.05$) igual al control (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de agentes inoculantes microbianos sobre contenido de clorofilas y carotenoides en el fruto de chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.). **Table 4.** Effect of microbial inoculant agents on xcat'ik pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) chlorophyll and carotenoids content.

Tratamiento	Clorofila a mg.g ⁻¹	Clorofila b mg.g ⁻¹	Clorofila total mg.g ⁻¹	Carotenoides mg.g ⁻¹
Control	0.017 ± 0.001 ^a	0.023 ± 0.002 ^a	0.039 ± 0.003 ^a	0.628 ± 0.102 ^b
<i>B. subtilis</i>	0.017 ± 0.002 ^a	0.020 ± 0.001 ^{ba}	0.037 ± 0.001 ^a	0.957 ± 0.166 ^a
<i>T. harzianum</i>	0.013 ± 0.00 ^b	0.015 ± 0.02 ^c	0.028 ± 0.002 ^b	1.026 ± 0.077 ^a
Consorcio microbiano	0.012 ± 0.001 ^b	0.017 ± 0.002 ^{bc}	0.029 ± 0.003 ^b	0.603 ± 0.044 ^b

n = 3, medias (± D.E) ^{abc} diferentes letras en una misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$; LSD).

Resultados similares fueron reportados por Chandrasekaran *et al.* (2019) para frutos de tomate en donde la inoculación con la cepa de *B. subtilis* CBR05 incrementó el contenido de carotenoides. Por su parte, Copeta *et al.* (2014) no obtuvieron incrementos del contenido de carotenoides en frutos de tomate inoculados con un consorcio microbiano a base de micorrizas. Al igual que Mena-Violante *et al.* (2006), quienes no observaron cambios en los niveles de carotenoides al inocular frutos de chile ancho (*Capsicum annuum* L. cv. San Luis) con consorcios microbianos a base de *Glomus fasciculatum*, *G. constrictum*, *G. geosporum* y *G. tortuosum*, en contraste con otro consorcio microbiano a base de *G. aggregatum*, *G. deserticola*, *G. geosporum*, *G. microaggregatum* y *S. coremioides* donde encontraron un incremento de este metabolito secundario en los frutos de chile ancho. Las diferencias podrían deberse a la variación genética de los cultivos evaluados, a las complejas interacciones que se dan entre el inóculo y la planta que podrían no ser iguales en cuanto a la movilidad de nutrientes por ejemplo, la movilidad del nitrógeno que es un factor importante en la producción de los carotenoides (Arimboor *et al.*, 2014).

Este tipo de metabolitos están involucrados en procesos importantes como la foto protección, estrés y fotosíntesis, adicionalmente son precursores de la vitamina A y también se ha reportado que algunos compuestos carotenoides evitan que los humanos desarrollen ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Además protegen a la planta contra el daño foto oxidativo y la ayudan a mantener su estructura. La biodisponibilidad de estos pigmentos está influenciada por factores dietéticos incluyendo el tipo y la cantidad de los carotenoides consumidos y la naturaleza de los alimentos que los contengan, el almacenamiento poscosecha, prácticas de procesamiento y cocción de los alimentos (Shumskaya y Wurtzel, 2013; Arimboor *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

Consideramos que la información generada en el presente estudio ofrece la oportunidad de mejorar la calidad nutracéutica del chile xcat'ik al incrementar el contenido de los carotenoides inoculando con *B. subtilis* y *T. harzianum* y dadas las propiedades que se le atribuyen a estos metabolitos secundarios, los frutos podrían proporcionar un efecto positivo en la salud humana.

Clorofilas

En relación a los niveles de clorofila, se encontró variación estadística ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos. Los frutos obtenidos de plantas fertilizadas con *B. subtilis* fueron similares al control en los contenidos de clorofilas a y b. Sin embargo, con la inoculación de *T. harzianum* y el consorcio microbiano se observó un decremento en el contenido de estos pigmentos (Tabla 4). Resultados similares a los nuestros fueron reportados por Cisternas-Jamet *et al.* (2020) en estudios realizados con *C. annuum* inoculados con *B. amyloliquefaciens* en diferentes estados de madurez y donde el efecto de la inoculación tampoco incrementó los contenidos de clorofila. Una posible explicación de los resultados obtenidos en nuestro trabajo podría ser que la síntesis de las clorofilas requiere de la presencia de luz y en consecuencia los inoculantes podrían verse afectados por la luz (Cruz, 2016). Otro factor importante a considerar es la presencia del Mg, el principal componente de la molécula de clorofila, es probable que la movilidad por efecto de los inoculantes microbianos a través del sistema radicular de la planta no haya sido efectiva (Sood *et al.*, 2020). También se sabe que a medida que la madurez del fruto avanza se produce una degradación de la molécula de clorofila, pero este mecanismo hace que se expresen otros pigmentos como los carotenos (Hörtensteiner y Kräutler, 2011). Esto concuerda con nuestros resultados en donde destaca el contenido de carotenoides en relación con la clorofila.

Determinación de la actividad antioxidante

En la Tabla 5 se puede observar que la inoculación microbiana influyó positivamente en los contenidos de la actividad antioxidante, la cual es capaz de reducir las reacciones en cadena que son dañinas para el ser humano. Aparentemente el consorcio microbiano actuó mejor como

Tabla 5. Efecto de agentes inoculantes microbianos sobre la actividad antioxidante del fruto de chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.).

Table 5. Effect of microbial inoculant agents on xcat'ik pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) antioxidant activity.

Tratamiento	DPPH [•] μmol 100g ⁻¹ 30 min	DPPH [•] μmol 100g ⁻¹ 60 min	ABTS ^{•+} μmol 100g ⁻¹ 1 min	ABTS ^{•+} μmol 100g ⁻¹ 7 min
Control	169.62 ±3.50 ^c	373.30 ±31.02 ^b	532.74 ±26.33 ^c	741.53 ±43.07 ^c
<i>B. subtilis</i>	326.26 ±65.25 ^b	455.60 ±70.59 ^b	591.66 ±13.16 ^{ab}	875.36 ±14.95 ^a
<i>T. harzianum</i>	320.00 ±29.40 ^b	447.03 ±41.74 ^b	619.74 ±21.50 ^a	899.93 ±39.10 ^a
Consortio microbiano	417.95 ±14.99 ^a	569.9 ±14.19 ^a	565.66 ±11.50 ^{bc}	809.63 ±10.80 ^b

n=3, medias (± D.E) ^{abc}diferentes letras en una misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$; LSD).

regulador de la síntesis de los compuestos antioxidantes por el método del DPPH[•], en donde presentó variación estadística ($P \leq 0.05$) entre tratamientos y se observó un incremento de la actividad antioxidante a los 30 y 60 min en el fruto de chile xcat'ik, seguido de *B. subtilis* and *T. harzianum*.

Chandrasekaran *et al.* (2019) reportaron resultados similares a los nuestros para tomate (*Solanum lycopersicum*) utilizando *B. subtilis* como inóculo. Los frutos mostraron un incremento en la actividad antioxidante por el método del DPPH[•] y el ABTS^{•+} con respecto a frutos comerciales y un testigo sin inoculación. Del mismo modo, Pascale *et al.* (2017) registraron incrementos en la actividad antioxidante con la inoculación de *T. harzianum* en frutos de uva.

Por otra parte, los tratamientos con *B. subtilis* y *T. harzianum* mostraron altos niveles de la actividad antioxidante en comparación con el control con el método del radical ABTS^{•+} en ambos tiempos (1 y 7 min).

Los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} tienen un electrón desapareado con una absorción característica, que disminuye significativamente con la exposición a captadores de protones (Lee *et al.*, 2015). Estos ensayos están basados en una reacción redox la cual involucra la transferencia de electrones, en donde los diferentes compuestos antioxidantes presentes en la muestra donan uno o dos electrones para reducir a los radicales o cationes (DPPH[•] o ABTS^{•+}) indicando una medida precisa de la capacidad antioxidante con la finalización de la reacción (Wootton-Beard *et al.*, 2011). En este caso el radical ABTS^{•+} demostró ser más sensible porque la cinética de reacción fue más rápida y su respuesta a los compuestos antioxidantes fue mejor.

En el presente estudio hemos evaluado la actividad antioxidante a través de dos métodos de determinación. Se ha indicado que ningún método es suficiente para estimarla por los complejos mecanismos que se involucran, por lo tanto, es necesario un método complementario. En este contexto, es posible que el consorcio microbiano promueva la síntesis de moléculas antioxidantes con carácter hidrofílico y *B. subtilis* y *T. harzianum* le den preferencia a la síntesis de moléculas con carácter lipofílico. Esto se explica porque el método del DPPH[•] engloba la determinación de las moléculas hidrofílicas

y el método del ABTS⁺ da preferencia a la determinación de los antioxidantes lipofílicos (Li *et al.*, 2014).

Por los resultados encontrados respecto a los contenidos de ácido ascórbico, fenoles totales y flavonoides en el chile xcat'ik, es probable que parte de esta actividad antioxidante sea por acción de los carotenoides y posiblemente el chile xcat'ik posea otros agentes antioxidantes como las antocianinas, vitamina E, tocoferoles, saponinas, terpenoides, triterpenos, alcaloides, taninos, xantonas, lactonas y ácidos orgánicos; metabolitos secundarios a los cuáles también se les puede atribuir una alta actividad antioxidante (Hidalgo *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Tag *et al.*, 2014). De esta manera resulta de interés ampliar los estudios sobre otras moléculas antioxidantes en este cultivo.

Cuantificación de capsaicinoides

Los inoculantes microbianos fueron estadísticamente iguales entre sí (P ≤ 0.05) para los contenidos de capsaicina, pero diferentes al control quien fue predominante. En contraste, para los contenidos de dihidrocapsaicina no existieron diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0.05) entre los inoculantes microbianos y el control (Tabla 6).

La variación en el comportamiento de los inoculantes podría atribuirse a que, durante el proceso de interacción entre estos y las plantas se provoca una modulación en el mecanismo molecular para activar redes a nivel de enzimas, metabolitos y genes que pueden expresarse de diversas formas (Singh *et al.*, 2020), Por otra parte, la concentración de capsaicinoides también depende del genotipo y la interacción ambiental (Gurung *et al.*, 2011), en donde destacan las condiciones ambientales y la nutrición de las plantas, la respuesta de los inoculantes en los cultivos depende de la planta hospedera, la ubicación geográfica del cultivo, las estaciones climáticas, prácticas agrícolas, tipo de cepas bacterianas, fertilidad del suelo y la interacción con la microflora nativa del suelo, entre otros factores bióticos y/o abióticos (Debnath *et al.*, 2019).

Como se pudo observar con las prácticas empleadas en este estudio no todas las variables evaluadas tuvieron un efecto positivo. Sin embargo, es necesario identificar los factores que tienen poca o ninguna respuesta hacia la mejora de los cultivos o la calidad de los frutos con el fin de ajustar dosis, microorganismos, mezclas, uso total o parcial

Tabla 6. Efecto de agentes inoculantes microbianos sobre contenido de capsaicinoides en el fruto de chile xcat'ik.

Table 6. Effect of microbial inoculant agents on xcat'ik pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) capsaicinoids content.

Tratamiento	Capsaicina (mg kg ⁻¹)	Dihidrocapsaicina (mg kg ⁻¹)
Control	355.14±17.67 ^a	176.55±2.29 ^a
<i>B. subtilis</i>	269.80±48.67 ^b	174.36±0.31 ^a
<i>T. harzianum</i>	236.24±22.65 ^b	186.82±12.59 ^a
Consorcio microbiano	251.40±46.51 ^b	189.57±17.60 ^a

n=3, medias (± D.E) con diferentes letras en una misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05; LSD).

entre otros factores. Una producción efectiva dependerá de muchos factores, pero cuanto mejor conozcamos el funcionamiento de cada uno de ellos, más cerca estaremos del uso eficiente de los inoculantes microbianos y mejorar su aprovechamiento.

CONCLUSIONES

Los inoculantes microbianos presentaron diferentes comportamientos en las variables evaluadas tanto *Bacillus subtilis* como *Trichoderma harzianum*, donde demostraron versatilidad para incrementar el contenido de carotenoides y la actividad antioxidante por el método del ABTS⁺ (1 y 7 min) en el chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.), mientras que el consorcio microbiano incrementó la actividad antioxidante mediante el método del DPPH (30 y 60 min). Este estudio ayudó a evidenciar que los inoculantes microbianos pueden ser utilizados para manipular las concentraciones del contenido de carotenoides y la actividad antioxidante en el chile xcat'ik. Estos hallazgos resultan de importancia porque estos metabolitos secundarios son de interés ya que podrían promover un efecto positivo en la salud humana.

REFERENCIAS

Arimboor, R., Natarajan, R.B., Ramakrishna-Menon, K., Chandrasekar, L.K., Moorkoth, V. 2014. Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability- a review. *J Food Sci. Technol.* 52: 1258-1271.

Baslam, M., Garmendia, I., Goicoechea N. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5504-5515.

Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W. 2014. Agricultural uses of plant bio stimulants. *Plant Soil.* 383: 3-41.

Chandrasekaran, M., Chun, S.C., Oh J.W., Paramasivan M., Saini, R.K., Sahayarayan, J.J. 2019. *Bacillus subtilis* CBR05 for tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits in South Korea as a Novel Plant Probiotic Bacterium (PPB): implications from total phenolics, flavonoids, and carotenoids content for fruit quality. *Agronomy.* 9: 1-11.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 10: 178-182.

Chatterjee, R., Koner, S., Datta, S. 2019. Impact of Microbial Inoculants on the Performance of Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.) Varieties under Foot Hills of Eastern Himalayan Region. *Int. J Curr. Microbiol. Appl.* 5: 131-138.

Cisneros-Pineda, O., Torres-Tapia, L.W., Gutiérrez-Pacheco, L.C., Contreras-Martín, F., Gonzáles-Estrada, T., Peraza-Sánchez, S. 2007. Capsaicinoids cuantification in pepper peppers cultivated in the state of Yucatán México. *Food Chem.* 104: 1755-1760.

Cisternas-Jamet, J.R. Salvatierra-Martínez., A. Vega-Gálvez., A. Stoll., Uribe, E., Goñih, M.G. 2020. Biochemical composition as a function of fruit maturity stage of bell pepper (*Capsicum annuum*) inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Sci. Hortic-Amsterdam*, 263: 1-9.

- Collins, D.M., Wasmund, M.L.M., Osland, P.W.B. 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high performance liquid chromatography. *Hortscience*, 30: 137-139.
- Coppeta, A., Bardi, L., Bertolone, E., Berta, G. 2014. Fruit production and quality of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) are affected by green compost and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Biosist*, 1: 106-115.
- Cruz, A.F. 2016. Effect of light-emitting diodes on arbuscular mycorrhizal fungi associated with bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) and millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br]. *Bioagro*, 28: 163-170.
- Debnath, S., Rawat, D., Kumar-Mukherjee, A., Adhikary, S., Kundu, R. 2019. Applications and Constraints of Plant Beneficial Microorganism in Agriculture. Mahyar-Mirmajlessi S., Radhakrishnan R (eds.) *Biostimulants in Plants Science*. IntechOpen, p. 2-25.
- Dürüst, N., Dogan, S., Dürüst, Y. 1997. Ascorbic acid and element contents of food of Trabzon (Turkey). *J Agric. Food Chem.* 45: 2085-2087.
- Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M., Gunes, A. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Sci Hortic-Amsterdam*, 124: 62-66.
- Gurung, T., Techawongstein, S., Suriharn, B., Techawongstein, S. 2011. Impact of Environments of the Accumulation of Capsaicinoids in *Capsicum* spp. *Hortscience*. 46: 1576-1581.
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Pascual-Teresa, S. 2010. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem.* 121: 691-696.
- Hörtensteiner, S., B. Kräutler. 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics*. 1807: 977-988.
- Jiménez-Gómez, A., García-Estévez, I., García-Fraile, P., Escribano-Bailón, M.T., Rivas, R. 2020. Increase in phenolic compounds of *Coriandrum sativum* L. after the application of a *Bacillus halotolerans* biofertilizer. *J Sci. Food Agric.* 100: 2742-2749.
- Karppinen, K., Zoratti, L., Nguyenquynh, N., Häggman, H., Jaakola, L. 2016. On the Developmental and Environmental Regulation of Secondary Metabolism in *Vaccinium* spp. *Berries*. *Front. Plant Sci.* 7: 1-9.
- Khalid, M., Hassani, D., Bilal, M., Asad, F., Huang, D. 2017. Influence of bio-fertilizer containing beneficial fungi and rhizospheric bacteria on health promoting compounds and antioxidant activity of *Spinacia oleracea* L. *Botanical Studies*, 58: 1-9.
- Kim, H.J., Chen F., Wu, C., Wang, X., Chung, H.Y., Jin, Z. 2004. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 2849-2854.
- Lee, K.J., Oh, Y.C., Cho, W.K., Ma, J.Y. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activity determination of one hundred kinds of pure chemical compounds using offline and online screening HPLC assay. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 1-13.
- Li, J., Zhu, Z., Gerendás, J. 2014. Effects of nitrogen and sulfur on Total phenolics and antioxidant activity in two genotypes of leaf mustard. *Journal of Plant Nutrition*, 31: 1642-1655.
- Lombardi, N., Caira, S., Troise, A.D., Scaloni, A., Vitaglione, P., Vinale, F., Marra, R., Salzano, A.M., Lorito, M., Woo, S.L. 2020. *Trichoderma* Applications on Strawberry Plants Modulate the Physiological Processes Positively Affecting Fruit Production and Quality. *Front. Microbiol.* 11: 1-17.
- Mellidou, I., Kanellis, A. 2017. Genetic Control of Ascorbic Acid Biosynthesis and Recycling in Horticultural Crops. *Front. Chem.* 5: 1-8.
- Mena-Violante, H.G., Ocampo-Jiménez, O., Dendooven, L., Martínez-Soto, G., González-Castañeda, J., Davies, Jr. F.T., Olalde-Portugal, V. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance fruit growth and quality of chile ancho (*Capsicum annuum* L. cv San Luis) plants exposed to drought. *Mycorrhiza*. 16: 261-267.
- Ógata-Gutiérrez, K., Zúñiga-Dávila, D. 2020. Bacteria-Plant interactions: an added value of microbial inoculation. *Rev. Peru Biol.* 27: 21-25.
- Ortega-García, J.G., Montes-Belmont, R., Rodríguez-Monroy, M., Ramírez-Trujillo, J.A., Suárez-Rodríguez, R., Sepúlveda-Jiménez, G. 2015. Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions. *Sci. Hortic-Amsterdam*, 195: 8-16.
- Panche, A.N., Diwan, A.E., Chandra, S.R. 2016. Flavonoids: an overview. *J Nut. Sci.* 5: 1-15.
- Park, Y.J., Park, S.Y., Valan-Arasu, M., Al-Dhabi N.A., Ahn, H.G., Kim, J.K., SU Park. 2017. Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of tagetes flowers. *Molecules*, 22: 1-14.
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., Marra, R., Lombardi, N., Woo, S.L., Lorito, M. 2017. *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *J Crop Prot.* 92: 176-181.
- Pylac, M., Oszust, K., Frąc, M. 2019. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Rev environ. Sci. BioTech.* 18: 597-616.
- Ramos-Solano, B., García-Villaraco, A., Gutiérrez-Mañero, F.J., Lucas, J.A., Bonilla, A. 2013. Annual changes in bioactive contents and production in field-grown blackberry after inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant Physiol. Biochem.* 74: 1-8.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Rodrigues, C.A., Nicácio, A.E., Jardim, I.C.S.F., Visentainer, J.V., Maldaner, L. 2019. Determination of phenolic compounds in red sweet pepper (*capsicum annum* l.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS analysis and its relation to antioxidant activity. *J Braz Chem. Soc.* 30: 1229-1240.
- Rouphael, Y., Collab, G., Grazianic, G., Ritienic, A., Cardarellid, M.A. 2017. Phenolic composition, antioxidant activity and mineral profile in two seed-propagated artichoke cultivars as affected by microbial inoculants and planting time. *Food Chem.* 234: 10-19.
- Russo, V.M., Perkins, V.P. 2010. Yield and nutrient content of bell pepper pods from plants developed from seedlings inoculated, or not, with microorganisms. *Hort. Sci.* 45: 352-358.
- Salveit, M.E. 2017. Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. Chapter 5. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 2nd Edition, Edit. Elhadi M Yahia.

- Shumskaya, M., Wurtzel, E.T. 2013. The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Sci.* 208: 58-63.
- Silva, L.R., Azevedo, J., Pereira, M.J., Carro, L., Velázquez, E., Peix, A., Valentao, P., Andrade, P.B. 2014. Inoculation of the nonlegume *Capsicum annuum* (L.) with *Rhizobium* strains. 1. Effect on bioactive compounds, antioxidant activity, and fruit ripeness. *J. Agric. Food Chem.* 62: 557-564.
- Singh, D.P., Singh, V., Gupta, V.K., Shukla, R., Prabha, R., Sarma, BK., Patel, J.S. 2020. Microbial Inoculation in Rice Regulates Antioxidative Reactions and Defense Related Genes to Mitigate Drought Stress. 10: 1-17.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A Jr. 1965. Colorimetric of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 16: 144-158.
- Soltani, A., Weraduwege, S.M., Sharkey, T., Lowry, D. 2019. Elevated temperatures cause loss of seed set in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) potentially through the disruption of source-sink relations ships. *BMC Genomics*, 20: 1-18.
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M.S., Ramakrishan, M., Landi, M., Franiti, A., Sharma, A. 2020. *Trichoderma*: The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants.* 9: 2-25.
- Tag, H.M., Kelany, O.E., Tantawy, H.M., Fahmy, A.A. 2014. Potential anti-inflammatory effect of lemon and hot pepper extracts on adjuvant-induced arthritis in mice. *J Basic Appl. Zoo.* 67: 149-157.
- Wheeler, G., Ishikawa, T., Pornsaksit, V., Smirnov, N. 2015. Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *Elife* 4: 2104-2105.
- Wootton-Beard, P., Moran, A., Ryan, L. 2011. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Res Int.* 44:217-224.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., Lu, J. 2010. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chem.* 119: 1557-1565.
- Zeb, A., Imran, M. 2019. Carotenoids, pigments, phenolic composition and antioxidant activity of *Oxalis corniculata* leaves. *Food Biosci.* 32: 1-9.
- Zhao, Y., Zhang, M., Yang, W., Di, H.J., Ma, L., Liu, W., Li, B. 2019. Effects of microbial inoculants on phosphorus and potassium availability, bacterial community composition, and pepper growth in a calcareous soil: a greenhouse study. *J Soils Sediments.* 19: 3597-3607.

Vigilancia de la resistencia bacteriana en unidades de salud de Hermosillo y Ciudad Obregón, Sonora, México

Surveillance of bacterial resistance to antibiotics in health units in Hermosillo and Ciudad Obregón, Sonora, Mexico

Bolado-Martínez E^{1*}, Valenzuela-Arvizu AS¹, Álvarez-Ainza ML¹, Álvarez-Hernández G², Cano-Rangel MA³, ** Grupo de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en Hospitales Sonora

¹ Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.

² Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Donaldo Colosio y Francisco Q. Salazar S/N, CP 83000, Hermosillo, Sonora México.

³ Hospital Infantil del Estado de Sonora, Calle de la Reforma 355, CP 83100 Hermosillo, Sonora México.

**Listado completo al final del manuscrito

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar los porcentajes de resistencia a los antibióticos, de bacterias colectadas de unidades de salud (US) en Hermosillo y Ciudad Obregón, Sonora, México. Participaron ocho US de Hermosillo y tres de Ciudad Obregón, nueve pertenecen al sector público y dos al sector privado. Se analizaron los resultados de identificación y drogorresistencia de 15,653 aislamientos en un periodo de un año (2019 - 2020). Posteriormente, se compararon seis unidades de salud de Hermosillo, para los periodos 2014 - 2015 y 2019 - 2020. Las diferencias, entre poblaciones y periodos de tiempo, se obtuvieron mediante chi cuadrada. Durante el periodo 2019 - 2020, los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Escherichia coli* (32.9 %), *Klebsiella pneumoniae* (8.4 %), *Pseudomonas aeruginosa* (7.6 %) y *Staphylococcus aureus* (6.6 %). Se detectaron diferencias en la resistencia a fármacos ampliamente utilizados como cefalosporinas, quinolonas y carbapenémicos, entre las instituciones de Hermosillo y Ciudad Obregón. En seis unidades de salud de Hermosillo, se observó una disminución en los porcentajes de resistencia para la mayoría de los antibióticos ensayados en 2020, respecto a 2015. Se encontraron diferencias significativas en la resistencia a los antibióticos entre los aislamientos clínicos de Hermosillo y Ciudad Obregón, dos ciudades separadas por sólo 252 km.

Palabras clave: Resistencia, antibióticos, Instituciones de Salud, Sonora, México.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the antibiotic resistance percentages of bacteria collected from health units (HU) in Hermosillo and Ciudad Obregón, Sonora, Mexico. Eight HU from Hermosillo and three HU from Ciudad Obregón, nine belong to the public sector and two to the private sector. Overall, 15,653 results of identification and drug resistance from clinical bacterial isolates were analyzed for a one-year period (2019 - 2020). Subsequently, a comparative study was carried out for six health units in Hermosillo, for 2014 - 2015 and 2019 - 2020 periods. Differences between

populations and time periods were assessed through the Chi square test, for differences among populations and time periods. Altogether, for the 2019 - 2020 period the most frequently isolated microorganisms were *Escherichia coli* (32.9 %), *Klebsiella pneumoniae* (8.4 %), *Pseudomonas aeruginosa* (7.6 %) and *Staphylococcus aureus* (6.6 %). Different resistance percentages to widely used drugs such as cephalosporins, quinolones and carbapenems were detected. A significant decrease in resistance percentages was observed, in six HU in Hermosillo, for most of the antibiotics tested in 2020, compared to 2015. Significant differences were found in antibiotic resistance between clinical isolates from Hermosillo and Ciudad Obregón, two cities that are separated by only 252 km (156 miles).

Key words: Antibiotic resistance, Health institutions, Sonora, Mexico.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos representa una amenaza mundial de creciente preocupación para la salud humana, animal y ambiental, lo que ha llevado a la utilización del concepto "una sola salud" (McEwen y Collignon, 2018). Según estimaciones de expertos, para el año 2050 habrá 10 millones de vidas en riesgo anualmente y un costo acumulado de 100 billones de dólares americanos, debido al aumento de infecciones resistentes a los medicamentos si no se aplican soluciones proactivas de inmediato para frenar el incremento en los niveles de resistencia a los antibióticos (O'Neill, 2016). Se han propuesto numerosas recomendaciones, resoluciones e informes, pero se ha avanzado poco (Aslam *et al.*, 2018). En México se han llevado a cabo esfuerzos para afrontar esta problemática, tales como la integración de redes de vigilancia de la resistencia (entre ellas, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica -RHOVE, SIREVA y GIVEBPVac-Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación), Comités de Farmacia y Terapéutica en los Hospitales (COFAT), así como la regulación de la venta de antibióticos sólo con receta médica en farmacias (Ancer *et al.*, 2018). En adición,

*Autor para correspondencia: Enrique Bolado Martínez
 Correo electrónico: enrique.bolado@unison.mx

Recibido: 25 de marzo de 2022

Aceptado: 6 de junio de 2022

la naturaleza crítica del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, exige una relación de trabajo cercana y positiva entre los médicos y los microbiólogos (Miller *et al.*, 2018).

La vigilancia es una herramienta esencial para generar datos que contribuyan al diseño de políticas *ad hoc* y las respuestas de prevención y control de infecciones, y es la piedra angular para evaluar la propagación de la resistencia a los antimicrobianos, e informar y monitorear el impacto de las estrategias locales, nacionales y globales (World Health Organization, 2017).

Existen diferencias entre regiones y países, y dentro de cada uno de ellos, en su capacidad para llevar a cabo la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. A pesar de que muchos países han hecho progresos considerables en el establecimiento de la vigilancia de la resistencia bacteriana, las limitaciones siguen siendo relacionadas con acceso a nuevas tecnologías y la limitación en los recursos metodológicos y financieros (World Health Organization, 2012).

En México, en el año 2018 se publicó el acuerdo por el que se declaró la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos (Ancer *et al.*, 2018). En dicho acuerdo se estipula que "*Las instituciones de educación superior juegan un papel preponderante en la atención a este problema, ya que los médicos y demás trabajadores de la salud, son actores fundamentales para contender con esta situación*". Adicionalmente uno de los resultados esperados de la estrategia nacional es "*Monitorear la susceptibilidad que se tiene con las cepas de circulación en México*".

En Sonora, un estudio previo en seis de las instituciones de salud de Hermosillo, permitió identificar altos porcentajes de resistencia a los antibióticos en los aislamientos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, durante el periodo 2014-2015 (Bolado-Martínez *et al.*, 2018). Por consiguiente, es necesario fortalecer el trabajo multidisciplinario e interinstitucional para la vigilancia de la resistencia a los antibióticos en instituciones de salud regionales y con ello participar en el abordaje del problema. Por otro lado, en años recientes, el grupo dirigido por la Dra. Elvira Garza ha realizado una vigilancia, en distintos laboratorios de todo el país, a través de la red INVIFAR (Garza-González *et al.*, 2019).

Los objetivos del presente trabajo fueron: (1) analizar los porcentajes de resistencia a los antibióticos, en bacterias recuperadas a partir de muestras clínicas de unidades de salud Hermosillo y Ciudad Obregón, Sonora; y (2) analizar y comparar los porcentajes de resistencia en seis instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, respecto a lo detectado en 2014 - 2015.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron convenios de colaboración con 11 unidades médicas (ocho de Hermosillo y tres de Ciudad Obregón, Sonora, de las cuales nueve pertenecen al sector público y dos al sector privado), que son las ciudades de mayor población en Sonora. Se diseñó un estudio transversal

para identificar y obtener los resultados de susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias más frecuentemente aisladas a partir de cualquier muestra clínica, recibida en las áreas de microbiología de los laboratorios clínicos de las unidades de salud participantes. Se empleó un muestreo no probabilístico de aislamientos clínicos consecutivos y no repetitivos del 1 de julio de 2019 al 30 de junio de 2020. La identificación de los microorganismos, así como las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, se realizaron en equipos VITEK® (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France; 10 instituciones) o Phoenix Automated Microbiology System® (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA; una institución), de acuerdo con los criterios de interpretación del Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico (CLSI por sus siglas en inglés), (CLSI, 2019). La información fue recolectada de las bases de datos de cada institución y procesada en el software WHONET 2020 (https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/AMR_WHONET_SOFTWARE/en/), bajo estrictos procedimientos de confidencialidad. El análisis estadístico se realizó con el software CDC Epi Info, versión 7.2.3.1 para Windows. La significancia estadística de los datos fue analizada utilizando la prueba de chi cuadrada, se consideraron significativos los resultados con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Durante el periodo de estudio, se recuperaron resultados de 15,653 aislamientos bacterianos. Las muestras mayormente procesadas fueron: orina (6,853; 43.8%), sangre (1,367; 8.7%), secreción bronquial (1,024; 6.5%) exudado faríngeo (712; 4.5%), exudado vaginal (709; 4.5%) y herida (707; 4.5%). Respecto a los microorganismos recuperados, el microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *Escherichia coli* (5,148; 32.9%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (1,320; 8.4%), *Pseudomonas aeruginosa* (1,192; 7.6%) y *Staphylococcus aureus* (1,028; 6.6%). La mayor proporción de aislamientos clínicos se recuperó de pacientes de consulta externa (40.9%; 6,406), seguidos por los de salas de urgencias (8.9%; 1,386). Las unidades de terapia intensiva (UTI) aportaron 716 (4.6%) aislamientos, 315 procedían de UTI para pacientes adultos y 301 de UTI neonatales.

En la tabla 1 se despliega la comparación de los porcentajes de resistencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* en las muestras estudiadas de ambas ciudades. En general, se observaron diferencias significativas, aunque para *E. coli* los porcentajes de resistencia fueron mayores en Ciudad Obregón, excepto para cefepima. Además, fueron notorios los altos porcentajes de resistencia a ciprofloxacina y beta-lactámicos en las dos ciudades, sobre todo considerando que la principal muestra clínica evaluada fue la orina.

También se observaron diferencias en la resistencia a los antibióticos para los aislamientos de *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Tabla 2). Un hallazgo relevante en ambas ciudades fueron los elevados porcentajes de resistencia a los carbapenémicos en *P. aeruginosa* y la notable diferencia en el porcentaje de *S. aureus* resistente a meticilina o SARM, con base en los resultados obtenidos para la resistencia a oxacilina.

Tabla 1. Porcentajes de resistencia a los antibióticos, para aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, recuperados en 11 unidades de salud de Hermosillo y Ciudad Obregón, Sonora México.

Table 1. Antibiotic resistance percentages for *E. coli* and *K. pneumoniae* clinical isolates, recovered from 11 health institutions in Hermosillo and Ciudad Obregón, Sonora, Mexico

Antibiótico	<i>Escherichia coli</i>				Valor de p
	Hermosillo		Ciudad Obregón		
	Aislamientos	%R	Aislamientos	%R	
Amikacina	3535	1	1282	1	0.239
Ampicilina	3658	68	1282	72	0.005
Ampicilina/Sulbactam	3760	42	1281	42	0.864
Cefepima	3760	13	1283	11	0.025
Cefotaxima	2775	33	1215	39	0.001
Ceftazidima	3316	23	1217	28	0.002
Ceftriaxona	3761	33	1282	38	< 0.001
Cefuroxima	2765	34	1214	40	0.002
Cefuroxima axetil	2776	34	1214	40	0.002
Ciprofloxacina	3759	51	1283	62	< 0.001
Ertapenem	3755	1	1282	1	0.215
Fosfomicina	2344	2	1217	4	< 0.001
Gentamicina	3762	25	1282	30	0.003
Meropenem	3753	1	1276	0	0.015
Nitrofurantoína	3219	8	1280	9	0.383
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	3653	48	1273	55	< 0.001
Antibiótico	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				Valor de p
	Hermosillo		Ciudad Obregón		
	Aislamientos	%R	Aislamientos	%R	
Amikacina	893	4	389	4	1.000
Ampicilina/Sulbactam	911	34	389	48	< 0.001
Cefepima	911	14	389	15	0.409
Cefotaxima	699	31	381	47	< 0.001
Ceftazidima	837	22	381	31	0.002
Ceftriaxona	911	31	389	47	< 0.001
Cefuroxima	698	34	381	51	< 0.001
Cefuroxima axetil	698	34	381	51	< 0.001
Ciprofloxacina	911	34	388	51	< 0.001
Ertapenem	911	3	389	6	< 0.001
Gentamicina	910	18	389	36	< 0.001
Meropenem	908	2	388	5	0.005
Nitrofurantoína	772	21	389	29	0.001
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	879	38	388	45	0.016

Tabla 2. Porcentajes de resistencia a los antibióticos, para aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, y *S. aureus*, recuperados en 11 unidades de salud de Hermosillo y Ciudad Obregón, Sonora México.

Table 2. Antibiotic resistance percentages for *P. aeruginosa* and *S. aureus* clinical isolates, recovered from 11 health institutions in Hermosillo and Ciudad Obregón, Sonora, Mexico.

Antibiótico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				Valor de p
	Hermosillo		Ciudad Obregón		
	Aislamientos	%R	Aislamientos	%R	
Amikacina	885	21	276	32	0.001
Cefepima	889	19	280	31	< 0.001
Ceftazidime	854	23	271	35	< 0.001
Ciprofloxacina	890	30	279	41	0.001
Gentamicina	886	14	276	21	0.008
Meropenem	884	34	277	38	0.144
Antibiótico	<i>Staphylococcus aureus</i>				Valor de p
	Hermosillo		Ciudad Obregón		
	Aislamientos	%R	Aislamientos	%R	
Ciprofloxacina	799	9	217	26	< 0.001
Clindamicina	799	21	215	33	< 0.001
Daptomicina*	750	6	213	7	0.748
Doxiciclina	659	2	213	1	0.770
Eritromicina	799	20	217	33	< 0.001
Gentamicina	798	6	217	8	0.336
Levofloxacina	710	7	217	26	< 0.001
Linezolid	799	2	217	2	0.752
Moxifloxacina	710	6	217	24	< 0.001
Nitrofurantoína	799	1	217	1	0.748
Oxacilina	798	17	216	29	< 0.001
Tetraciclina	710	5	216	4	0.572
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	799	3	217	7	0.019

* Para daptomicina, el resultado se interpreta como no susceptible.

Durante el periodo comprendido entre 01 de julio de 2014 y el 30 de junio de 2015 se realizó un estudio de vigilancia en seis de las 11 instituciones del estudio (Bolado-Martínez *et al.*, 2018), dichos resultados fueron comparados con los de la presente investigación. Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4, en general, se observó que existe una disminución significativa en los porcentajes de resistencia a la mayoría de los antibióticos, con excepción de gentamicina para *E. coli*, ciprofloxacina para *K. pneumoniae* y moxifloxacina para *S. aureus*.

DISCUSIÓN

A pesar de que Hermosillo y Ciudad Obregón se encuentran a una distancia de 252 km entre sí, se observaron diferencias significativas en los porcentajes de resistencia a los antibióticos en las principales bacterias recuperadas de

muestras clínicas humanas. Esto refuerza la observación de la Organización Mundial de la Salud respecto a que la vigilancia es una herramienta esencial para generar datos que contribuyan al diseño de políticas y estrategias locales, nacionales y globales (World Health Organization, 2017).

En el presente estudio, hubo un menor porcentaje de muestras resistentes de *Escherichia coli*, excepto para ciprofloxacina, que reportes previos en México (Miranda-Novales *et al.*, 2020). Esto no se apreció con respecto a trimetoprim con sulfametoxazol y aminoglucósidos, pues los hallazgos de este trabajo son semejantes a los de la red mexicana INVIFAR; en tanto para los beta-lactámicos (excepto carbapenémicos), se encontraron menores proporciones de resistencia que las reportadas por Garza-González y colaboradores (2019). A nivel mundial, el reporte del año 2021 del sistema GLASS (Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System) incluyó el análisis de entre 748,780 y 1'961,032 aislamientos

Tabla 3. Porcentajes de resistencia a los antibióticos, para aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, recuperados en seis unidades de salud de Hermosillo, Sonora México, durante los periodos 2014-2015 y 2019-2020.

Table 3. Antibiotic resistance percentages for *E. coli* and *K. pneumoniae* clinical isolates, recovered from six health institutions in Hermosillo, Sonora, Mexico, during 2014-2015 and 2019-2020.

Antibiótico	<i>Escherichia coli</i>				Valor de <i>p</i>
	2014 - 2015		2019 - 2020		
	Aislamientos	%R	Aislamientos	%R	
Amikacina	2845	1	2330	1	0.346
Ampicilina	2854	71	2454	66	0.001
Ampicilina/Sulbactam	2841	43	2556	41	0.244
Cefepima	2827	27	2557	11	< 0.001
Cefotaxima	747	33	1141	26	0.003
Ceftazidima	759	30	1241	19	0.000
Ceftriaxona	1173	29	2557	30	0.300
Cefuroxima	800	42	1141	27	< 0.001
Ciprofloxacina	2852	45	2556	48	0.092
Ertapenem	2244	1	1548	1	0.258
Gentamicina	2857	22	2558	25	0.014
Meropenem	2520	1.4	2550	0.5	0.002
Nitrofurantoína	2515	9	2441	9	0.898
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	2848	50	2448	47	0.021
Antibiótico	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				Valor de <i>p</i>
	2014 - 2015		2019 - 2020		
	Aislamientos	%R	Aislamientos	%R	
Amikacina	490	3	567	5	0.090
Ampicilina/Sulbactam	517	35	585	31	0.237
Cefepima	505	25	585	12	< 0.001
Cefotaxima	165	25	284	16	0.024
Ceftazidima	170	24	313	13	0.003
Ceftriaxona	514	27	585	29	0.534
Cefuroxima	154	39	284	20	< 0.001
Ciprofloxacina	519	14	585	31	< 0.001
Ertapenem	357	3	328	0	0.022
Gentamicina	521	19	584	11	0.001
Meropenem	464	4	582	2	0.050
Nitrofurantoína	417	22	517	18	0.155
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	506	30	554	35	0.074

Tabla 4. Porcentajes de resistencia a los antibióticos, para aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, y *S. aureus*, recuperados en seis unidades de salud de Hermosillo, Sonora México, durante los periodos 2014-2015 y 2019-2020.

Table 4. Antibiotic resistance percentages for *P. aeruginosa* and *S. aureus* clinical isolates, recovered from six health institutions in Hermosillo, Sonora, Mexico, during 2014-2015 and 2019-2020.

Antibiótico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				Valor de p
	2014 - 2015		2019 - 2020		
	Aislamientos	%R	Aislamientos	%R	
Amikacina	468	37	510	26	< 0.001
Cefepima	467	37	515	21	< 0.001
Ceftazidime	131	64	254	19	< 0.001
Ciprofloxacina	470	43	515	30	< 0.001
Gentamicina	471	29	512	13	< 0.001
Meropenem	455	39	510	36	0.40
Antibiótico	<i>Staphylococcus aureus</i>				Valor de p
	2014 - 2015		2019 - 2020		
	Aislamientos	%R	Aislamientos	%R	
Ciprofloxacina	956	12	522	8	0.012
Clindamicina	928	29	522	20	< 0.001
Daptomicina*	204	12	321	7	0.069
Eritromicina	831	24	522	21	0.185
Gentamicina	944	4	521	5	0.573
Levofloxacina	960	10	522	8	0.308
Linezolid	929	2	522	2	0.818
Moxifloxacina	840	4	522	7	0.012
Nitrofurantoína	783	2	483	2	0.455
Oxacilina	952	12	521	16	0.064
Tetraciclina	955	8	522	6	0.111
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	945	8	522	2	< 0.001

* Para daptomicina, el resultado se interpreta como no susceptible.

de *E. coli* procedentes de muestras urinarias y los resultados son consistentes con nuestros hallazgos con respecto a beta-lactámicos y ciprofloxacina (World Health Organization, 2021).

En el presente trabajo se encontró consistencia en los resultados obtenidos para *Klebsiella pneumoniae*, y los de la red UNCAR (Miranda-Navales *et al.*, 2020), de hecho, los valores máximos en Ciudad Obregón son próximos a la media nacional. No obstante, los resultados de las 11 unidades médicas evaluadas son considerablemente inferiores para cefepima, nitrofurantoína y trimetoprim con sulfametoxazol. El porcentaje de resistencia para cefepima también es inferior al reportado por la red INVIFAR (Garza-González *et al.*, 2019), aunque hay consistencia para el resto de los antibióticos evaluados. Los resultados de resistencia para *K. pneumoniae* también coinciden, en los límites inferiores para Hermosillo y en la región media para Ciudad Obregón con lo encontrado en aislamientos clínicos de vías urinarias de más

de 25 países (World Health Organization, 2021), no obstante, una diferencia notable con el reporte de GLASS, radica en el hecho de que la resistencia para cefepima es mucho menor en Hermosillo y Ciudad Obregón.

Exactamente lo opuesto se detectó para *Pseudomonas aeruginosa*. En el presente estudio se observó una mayor proporción de aislamientos resistentes para amikacina y ciprofloxacina que las documentadas por la red UNCAR (Miranda-Navales *et al.*, 2020) y valores discretamente superiores para estos mismos antibióticos a los de la red INVIFAR (Garza-González *et al.*, 2019). Adicionalmente los porcentajes de resistencia para cefepima, ciprofloxacina y meropenem, fueron más elevadas en el presente trabajo que los obtenidos en el resto del país (Garza-González *et al.*, 2019). Es importante mencionar que los carbapenémicos, como meropenem, se consideran antibióticos de último recurso en el manejo terapéutico de pacientes con infecciones causadas por bacterias multidrogosresistentes (Dong *et al.*, 2020).

En el caso de *Staphylococcus aureus*, se identificaron valores de resistencia significativamente más elevados en Ciudad Obregón. Las cifras reportadas por las redes nacionales UNCAR e INVIFAR (Garza-González *et al.*, 2019; Miranda-Navales *et al.*, 2020) coinciden con las observadas en Ciudad Obregón, excepto para oxacilina, lo que sugiere la presencia de un mayor número de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en esta localidad que en Hermosillo y en otras regiones del país. Es importante destacar que todas las unidades de salud participantes atienden a diferentes poblaciones y en algunas instituciones se encuentran pacientes que han recibido múltiples esquemas con antibióticos. La preocupación por estos resultados, radica en el hecho de que está bien documentado que los aislamientos de SARM frecuentemente presentan porcentajes de resistencia a múltiples antibióticos (Yao *et al.*, 2021).

En lo que respecta al estudio comparativo entre 2014-2015 y 2019-2020, para seis unidades de salud de Hermosillo, la disminución significativa en los porcentajes de resistencia a la mayoría de los antibióticos, podría explicarse de distintas maneras. En primer lugar, los resultados del estudio previo (2014-2015), así como observaciones y recomendaciones, se entregaron a cada unidad de salud participante, lo que permitió realizar ajustes en procedimientos metodológicos en el área de microbiología que pueden dar origen a falsos resultados de resistencia, algunos tan sencillos como la no inclusión de cepas ATCC para control de calidad, un problema bastante generalizado en los laboratorios clínicos (Nassar *et al.*, 2019).

Otra posibilidad, que pudo llevarse a cabo simultáneamente con lo anteriormente mencionado, es que los resultados obtenidos y compartidos con las unidades de salud que participaron en el primer estudio (2014-2015), llevaron a la mejor utilización y un uso racional de antibióticos en estas instituciones, como ha sido previamente demostrado (Yao *et al.*, 2020), aunque no se puede concluir al respecto pues, en el presente estudio no se evaluaron aspectos relacionados con la práctica clínica, algo que se recomienda en el futuro inmediato.

CONCLUSIONES

Los hallazgos del presente estudio documentan que hay un patrón diferenciado de resistencia a los antibióticos en las bacterias más frecuentemente recuperadas de muestras clínicas en Hermosillo y Ciudad Obregón, lo que pudiera tener relevancia clínica para médicos tratantes en los sitios estudiados. Por otro lado, es posible que la actualización del personal de las unidades de salud, permita un mejor desempeño de las pruebas para evaluar la resistencia a los antibióticos. Finalmente, se requieren investigaciones adicionales que incluyan más unidades médicas de estas ciudades, así como de otras regiones geográficas del Estado.

**Grupo de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en Hospitales Sonora

Dr. Enrique Bolado-Martínez, Dra. Idania Emedith Quintero Reyes, Dr. Ricardo Serrano-Osuna, MC Jesús Abraham Aguilar-Campos, QBC Karina Ayala-Castro, QFB Clarissa Gabriela Gutierrez-Cavada, QBC María Zulema Arenas-Ochoa, QB Cecilia Padilla Ibarra, QB Federico Félix Mendivil, QB Nataly Vanessa Ruvalcaba Garfías, QB Verónica Franco Madrid, QB Leonor Hilda Sanabia Ruiz, QBC Princess Janeth Ramos Enríquez, QFB Sandra Miranda Mauricio, QFB Dulce María López López, QBC Geovanna Itzel Quijada Acosta, QBC Alma Yahaira Meza Morales, MGS Alma Denia López Vázquez, MGS Lizbeth Soraya Duarte Miranda, MC Alejandro Molina Chavarría, QB Juan de Dios Castañeda Duarte, MGS Clara Guadalupe Castro Sánchez, QB Luz Elena Aganza Ballesteros, QB Tadeo Jazael Rene Ponce Galaz, MC Irma Elena Barroso Herrera y Cairo, QB Rode García Robles, QBC Oddry Guadalupe Euan Berrelleza, QBC René Andrade León, QBC Adán Zamora Cadena, QB Yolanda Alicia López Olivas, QB Samuel Pavel Escalante Armenta, QB Manuel L. Rodríguez Vega, QB Coral Lilián Murrieta Covarrubias, QB Pedro Quirarte Anaya, QB Ernesto Pérez Olivas, QB Diana Guadalupe Robles Belducea, MGS Gloria Martina Tarazón Noriega, QB Ana Dolores Quintero Grijalva, QB Cruz Griselda López López, QB Flor Amelia Tarazón Terán, Dra. Mónica Lozano Garcidueñas, QB Ana Margarita Durón Ramos, QB Elías Adalberto Sánchez Camarena, QB Margarita Acuña de la Vara.

REFERENCIAS

- Ancer, R.J., Galindo, S.R.M., Morales, A.J., Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Politécnico Nacional, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Academia Nacional de Medicina de México, Academia Mexicana de Cirugía, Academia Mexicana de Ciencias. 2018. Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. Diario Oficial de la Federación 05/06/2018. México.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M.H., Nisar, M.A., Alvi, R.F., Aslam, M.A., Qamar, M.U., Salamat, M.K.F. y Baloch, Z. 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*. 11: 1645-1658.
- Bolado-Martínez, E., Nevárez-López, A.R., Candia-Plata, M.C., Grupo de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en Hospitales de la Ciudad de Hermosillo, Sonora. 2018. Vigilancia de la resistencia bacteriana en instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. *Salud Pública de México*. 60(2): 117-119.
- CLSI. 2019. M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th Edition. CLSI document M100-S29 2019. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA.
- Dong, L.T., Espinoza, H.V., Espinoza, J.L. 2020. Emerging superbugs: The threat of Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*. *AIMS Microbiology*. 6(3):176-182.
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas,

- R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L.J., Maldonado-Anicacio, J.Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H.L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J.L., Avilés-Benítez, L.K., Feliciano-Guzmán, J.M., Peña-López, C.D., Couoh-May, C.A., Molina-Jaimes, A., Vázquez-Narvaez, E.G., Rincón-Zuno, J., Rivera-Garay, R., Galindo-Espinoza, A., Martínez-Ramírez, A., Mora, J.P., Corte-Rojas, R.E., López-Ovilla, I., Monroy-Colin, V.A., Barajas-Magallón, J.M., Morales-De-la-Peña, C.T., Aguirre-Burciaga, E., Coronado-Ramírez, M., Rosales-García, A.A., Ayala-Tarín, M.D., Sida-Rodríguez, S., Pérez-Vega, B.A., Navarro-Rodríguez, A., Juárez-Velázquez, G.E., Cetina-Umaña, C.M., Mena-Ramírez, J.P., Canizales-Oviedo, J., Moreno-Méndez, M.I., Romero-Romero, D., Arévalo-Mejía, A., Cobos-Canul, D.I., Aguilar-Orozco, G., Silva-Sánchez, J., Camacho-Ortiz, A. 2019. A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS One*. 14(3): e0209865.
- McEwen, S.A. y Collignon, P.J. 2018. Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Microbiology Spectrum* 2018. 6(2): ARBA-0009-2017.
- Miller, J.M., Binnicker, M.J., Campbell, S., Carroll, K.C., Chapin, K.C., Gilligan, P.H., Gonzalez, M.D., Jerris, R.C., Kehl, S.C., Patel, R., Pritt, B.S., Richter, S.S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J.D., Snyder, J.W., Telford, S. 3rd, Theel, E.S., Thomson, R.B. Jr, Weinstein, M.P. y Yao, J.D. 2018. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*. 67(6): 813-816.
- Miranda-Navales, M.G., Flores-Moreno, K., López-Vidal, Y., Rodríguez-Álvarez, M., Solórzano-Santos, F., Soto-Hernández, J.L., Ponce de León-Rosales, S., UNCAR Network. 2020. Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in mexican hospitals. *Salud Pública de México*. 62(1): 42-49.
- Nassar, M.S.M., Hazzah, W.A., Bakr, W.M.K. 2019. Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? *The Journal of the Egyptian Public Health Association*. 94(1): 4.
- O'Neill, J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. UK
- World Health Organization. 2012. The evolving threat of antimicrobial resistance – Introduction. En: *The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action*. pp 1-10. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. 2017. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report. Early implementation 2016-2017. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. 2021. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Yao, C.J., Li, Y.L., Pu, M.J., Luo, L.H., Xiong, Q., Xie, F.J., Li, T.L., Feng, P.M. 2021. Aminoglycosides with anti-MRSA Activity: a concise review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 21(27): 2483-2499.
- Yao, L., Yin, J., Huo, R., Yang, D., Shen, L., Wen, S., Sun, Q. 2020. The effects of the primary health care providers' prescription behavior interventions to improve the rational use of antibiotics: a systematic review. *Global Health Research and Policy*. 5: 45.

Genetic and molecular analysis of starch physicochemical properties and its relationship with endosperm modification in quality protein maize

Análisis genético y molecular de propiedades fisicoquímicas del almidón y su asociación con la modificación del endospermo en maíz de calidad proteínica

Vega-Álvarez E^{1,a}, Pineda-Hidalgo KV^{1,a}, Salazar Salas NY¹, Soto-López OA¹, Canizalez-Roman VA², Garzón-Tiznado JA¹, Gutiérrez-Dorado R¹, López-Valenzuela JA^{1*}

¹ Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria, Av. Américas y Josefa Ortíz de Domínguez S/N, CP 80010, Culiacán, Sinaloa, México.

² Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa, Calle Sauces S/N, CP 80019, Culiacán, Sinaloa, México.

ABSTRACT

Quality protein maize (QPM) was created converting the soft *opaque-2* endosperm into a vitreous phenotype, but the mechanisms involved in this modification are not completely understood. Recombinant inbred lines (RILs) derived from K0326Y QPM and W64A_o2 were used to identify quantitative trait loci (QTL) associated with starch physicochemical properties. Vitreousness-contrasting RILs were also used to evaluate the expression of starch biosynthesis genes. Mapping identified 5-6 QTLs for each trait that explained 66 % of the phenotypic variation. Three QTLs on bins 4.05, 5.04, and 9.03 were found close to the starch biosynthesis genes *Brittle-2* (*Bt2*), *Amylose extender-1* (*Ae1*), and *Waxy-1* (*Wx1*), respectively. The expression of *Wx1* was three-fold greater in K0326Y QPM than W64A_o2, and eight-fold higher in vitreous than opaque RILs, which corresponded with the greater granule bound starch synthase I (GBSSI) accumulation and the higher amylose content observed in the vitreous lines. The increased synthesis of amylose may result in starch granules with more amorphous regions that favor their compaction. These results suggest that endosperm modification in QPM is associated with the synthesis of starch containing more amylose during kernel development, which may facilitate the packing of the starch granules resulting in the vitreous phenotype.

Keywords: Quality protein maize, endosperm modification, starch, gene expression.

RESUMEN

El maíz de calidad proteínica (QPM) fue creado convirtiendo el endospermo suave *opaco-2* en un fenotipo vítreo, pero los mecanismos involucrados en esta modificación no se conocen por completo. Se utilizaron líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de las líneas K0326Y QPM y W64A_o2 para identificar *loci* de características cuantitativas (QTL) asociados con propiedades fisicoquímicas del almidón. También se usaron RILs contrastantes en vitreosidad para evaluar la expresión de genes de biosíntesis de almidón. El mapeo identificó 5 o 6 QTL para cada característica que explicaron en promedio el 66 % de la variación fenotípica. Tres de los

QTLs en los bins 4.05, 5.04 y 9.03 se encontraron cerca de los genes de síntesis de almidón *Brittle 2* (*Bt2*), *Amylose extender 1* (*Ae1*), y *Waxy 1* (*Wx1*), respectivamente. La expresión de *Wx1* fue tres veces mayor en K0326Y QPM que en W64A_o2 y ocho veces mayor en líneas vítreas en comparación con las opacas, lo que correspondió con la mayor acumulación de la enzima almidón sintasa unida al gránulo I (GBSSI) y el mayor contenido de amilosa observado en las líneas vítreas. El incremento en la síntesis de amilosa podría resultar en gránulos de almidón con más regiones amorfas que favorecen su compactación. Estos resultados sugieren que la modificación del endospermo en QPM está asociada con la síntesis de almidón conteniendo más amilosa durante el desarrollo del grano, lo cual podría facilitar el empaquetamiento de los gránulos de almidón resultando en el fenotipo vítreo.

Palabras clave: Maíz de calidad proteínica, modificación del endospermo, almidón, expresión génica.

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most important staple foods in developing countries, but it has a poor protein quality due to the deficiency of lysine (Lys) and tryptophan (Trp). The maize *opaque2* mutation typically doubles the Lys and Trp contents of wild-type kernels (Mertz *et al.*, 1964). However, the agronomic problems associated with the soft endosperm of this mutant limited its use. Plant breeders developed hard-kernel *o2* genotypes known as Quality Protein Maize (QPM) (Villegas *et al.*, 1992), but the mechanism by which the soft endosperm of *o2* becomes hard and vitreous in QPM is not entirely understood. Some studies have demonstrated an essential role for the 27-kDa γ -zein in endosperm modification (Wu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016); the enhanced accumulation of 27-kDa γ -zein favors the formation of protein bodies and their compaction between starch granules. Gibbon *et al.* (2003) proposed a complementary mechanism where alterations in starch structure facilitate that granules associate with one another, and the spaces between them are filled in the vitreous areas of the kernel.

Genetic analysis with recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross between W64A_o2 and K0326Y QPM

^aEstos autores contribuyeron de manera igualitaria en este artículo

*Autor para correspondencia: José A. López Valenzuela

Correo electrónico: jalopezvla@uas.edu.mx

Recibido: 1 de abril de 2022

Aceptado: 23 de junio de 2022

identified three quantitative trait loci (QTL) in bins 1.06, 7.02, and 9.03 associated with endosperm modification (Holding *et al.*, 2011). The locus in bin 7.02 was linked to the 27-kDa γ -zein, whereas that in bin 9.03 was close to starch biosynthesis genes. Salazar-Salas *et al.* (2014) evaluated the effect of each QTL on protein synthesis and starch physicochemical properties in the mature endosperm. They found that the vitreous phenotype of QPM is associated with the synthesis of less crystalline starch containing more amylose and short-intermediate amylopectin branch chains, which may favor starch granules packing. However, knowledge about the genetic and molecular basis of these changes in starch composition is scarce. This study aimed to identify QTL associated with starch physicochemical properties, and to evaluate the expression of starch biosynthesis genes and its relationship with starch composition in developing endosperm of maize lines contrasting in vitreousness and the genotype of QTL flanking markers.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Maize inbred lines K0326Y QPM (vitreous) and W64Ao2 (opaque) and 103 recombinant inbred lines (RIL) derived from their cross were used. They were grown at the Faculty of Agronomy field station in Culiacan, Sinaloa, Mexico (24°37'29" N, 107°26'37" W), in 2015. Kernels were degermed and ground into a fine powder. Based on QTLs previously identified for endosperm modification (Holding *et al.*, 2011), six RILs contrasting in vitreousness and the genotype of flanking markers were selected. Three vitreous RILs were homozygous for the K0326Y QPM allele and three opaque RILs were homozygous for the W64Ao2 allele. Developing kernels were obtained from the selected RILs 30 days after pollination (DAP), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use.

Starch composition

The K-TSTA and K-AMYL assays (Megazyme, Wicklow, Ireland) were used to determine total starch and amylose contents from developing and mature endosperm samples, respectively. Amylopectin content was obtained by difference.

Starch swelling power

It was determined according to Konik-Rose *et al.* (2001). About 40 mg of flour were mixed with 1 mL of water, vortexed, and then incubated for 30 min at 92.5 °C. The mixture was cooled and centrifuged (17,000 x g, 10 min). The swelling power was calculated by dividing the weight of the residue by the initial weight of flour.

Gelatinization enthalpy

Flour samples (2 mg) were mixed with deionized water (7 μ L) and sealed in hermetic pans for analysis with a differential scanning calorimeter (DSC-2920, TA Instruments, New Castle, USA) calibrated with indium; an empty pan was

used as a reference. The heating rate was 10°C/min over the temperature range (30-120 °C). Gelatinization enthalpy (ΔH_g) was calculated with TA Universal Analysis 2000 software (TA Instruments).

Genetic mapping

MapManager QTxb20 software (Manly *et al.*, 2001) and SSR linkage groups previously reported for the RIL population (Holding *et al.*, 2011) were used to identify QTL associated with starch composition, starch swelling, and gelatinization enthalpy by composite interval mapping (CIM) (Zeng, 1994). CIM was conducted with an additive regression model, and permutation tests (1000 shuffles) on individual chromosomes were performed to establish the significant threshold value of the likelihood ratio statistic (LRS) (Churchill and Doerge, 1994).

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from developing endosperm (30 DAP) according to Holding *et al.* (2008). Endosperms were ground in 200 μ L of RNA extraction buffer [50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, 150 mmol/L LiCl, 5 mmol/L EDTA, pH 8, 10 g/L SDS], added with 200 μ L of phenol/chloroform (1:1) pH 8, mixed and placed 5 min on ice. The aqueous phase was separated (13,000 x g, 10 min, 4 °C). Starch was removed using 1 mL trizol reagent (Life Technologies), followed by the addition of 200 μ L of phenol-chloroform (1:1), and then centrifuged (10,000 x g, 10 min, 4 °C). Nucleic acids were precipitated with one volume of isopropanol, centrifuged (10,000 x g, 10 min, 4 °C), the pellet washed with 70 % ethanol and resuspended in 50 μ L DEPC water. The obtained RNA was treated with DNase using the DNase I Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). cDNA was synthesized from 2 μ g of RNA using the Go Script TM reverse transcription system kit (Promega, Madison, USA).

Gene expression analysis

RT-qPCR was used to determine the 27-kDa γ -zein and starch biosynthesis genes transcript levels. The cDNA (75 ng) was amplified using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK). The PCR primers (Table 1) were designed using the Primer-BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). A real-time system StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) was used under the following conditions: 95 °C for 10 min, then 40 cycles at 95 °C (15 s) and 60 °C (1 min) with a ramp rate of 2.2 °C/s. The gene encoding retinoblastoma-related protein 1 (*RRB1*) was used as a control, and the expression values were calculated relative to the parental line K0326Y QPM (vitreous), which is the donor of the modifier genes that convert the soft endosperm of W64Ao2 to a vitreous phenotype in the RILs. The relative expression was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using the following equation: $2^{[(W_X - W_C) - (G_X - G_C)]}$, where X= gene of interest, C= control gene (*RRB1*), W=average cycle threshold (C_t) of K0326Y QPM, and G= average C_t of the other genotypes.

Tabla 1. Iniciadores específicos usados para RT-qPCR.**Table 1.** Gene-specific primers used for RT-qPCR.

Gene	Primer	Amplicon size (bp)
γ -zein	Fw GTATAAGTCCTAAAGTGGTGAGGAACA ¹	240
	Rv GAGCTGTAAGCATGTATTACAGATGAG ¹	
<i>Bt2</i>	Fw ATTACCGTTGCTGCCCTACC ²	115
	Rv ACTGCTCTCCTTTTCGGTTTCTC ²	
<i>Wx1</i>	Fw GAGGACGTCGTGTTCTGCTG ³	245
	Rv CAGTTGATCTCCGGCCTTC ³	
<i>Ae1</i>	Fw CCGACGCTGGACTATTTGGT ³	165
	Rv GCAACGAGTACCCCGCTATC ³	
<i>Zpu1</i>	Fw GCTTCAGTTGCATCCAGTGC ³	250
	Rv TGGGCAACGTCTTATTCAATC ³	
<i>RRB1</i>	Fw GCTGTTTCTGGTTATGTCTGTCTCCT ³	138
	Rv CTTTTGAGTACTTCTGTGCCTGAC ³	

γ -zein: 27kDa γ -zein; *Bt2*: Brittle-2 (ADP-glucose pyrophosphorylase, small subunit); *Wx1*: *Waxy-1* (Granule-bound starch synthase 1); *Ae1*: *Amylose extender 1* (Starch-branching enzyme); *Zpu1*: Pullulanase-type starch debranching enzyme 1; *RRB1*: Retinoblastoma-related protein 1; Fw, Forward; Rv, Reverse. ¹Holding *et al.* (2011); ²Huang *et al.* (2011); ³Jia *et al.* (2013).

Zein Extraction, Quantification, and SDS-PAGE Analysis

Developing endosperms were lyophilized and ground into a fine powder to obtain the zein fractions as described by Wallace *et al.* (1990). Total protein from 50 mg of endosperm flour was extracted overnight with 1 mL of borate buffer (12.5 mmol/L Na₂B₄O₇-10H₂O, 10 g/L SDS, 20 mL/L 2-mercaptoethanol, pH 10) at 37 °C. The extract was adjusted with ethanol (700 mL/L) to precipitate the non-zein fraction. Zein protein extracts (equivalent to 15 mg of flour) were vacuum-dried and resuspended in 100 μ L of deionized water. Five microliters were separated in 0.15 mg/mL polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and stained with Coomassie Blue R250. The Quantity One software (BioRad, Hercules, CA) was used to quantify by densitometry the protein bands.

Isolation of starch granules, extraction and identification of starch granule-associated proteins (SGAP)

Starch granules were isolated from developing (30 DAP) kernels, according to Grimaud *et al.* (2008). Kernels were soaked in 3 g/L sodium metabisulfite and 850 mL/L lactic acid (pH 3.8) for 48 h at 50 °C, and then the germ and pericarp were manually dissected. Endosperms were ground with a mortar and pestle in starch extraction buffer [50 mmol/L Tris-HCl, pH 7, 100 mL/L glycerol, 10 mmol/L EDTA, 1.25 mmol/L DTT] at 4 °C, passed through a 100 μ m filter and centrifuged at 13,000 x g for 15 min. Starch was washed five times with cold extraction buffer, 950 mL/L ethanol, and acetone and then dried for 12 h. For SGAP extraction, about 150 mg of starch were washed at 4 °C with water, gelatinization buffer [62.5 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20 g/L SDS, 50 mL/L β -mercaptoethanol], and 950 mL/L ethanol to remove superficial proteins. Then, starch samples were incubated with gelatinization buffer for 15 min in a boiling water bath to release SGAP. The paste formed

was frozen for 1 h, thawed for 20 min at 40 °C in a water bath and then centrifuged (13,000 x g, 30 min). The supernatant was collected and mixed with an equal volume of 300 g/L TCA/Acetone for at least 2 h to precipitate proteins. After centrifugation for 15 min at 4 °C, the SGAP pellet was washed three times with cold acetone and dried overnight at room temperature. SGAP were resuspended in thiourea buffer [7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 40 g/L CHAPS, 20 mmol/L DTT, 2 mL/L Triton-X100]. Protein extracts equivalent to 8 and 21 mg of starch were used for granule-bound starch synthase and low abundant SGAP, respectively; they were separated by SDS-PAGE using a 0.10 mg/mL polyacrylamide gel and identified by mass spectrometry according to Salazar-Salas *et al.* (2014).

Statistical analysis

Data correspond to the mean of three biological replicates with three technical replicates. It was analyzed using one-way ANOVA, and the Fisher test ($p < 0.05$) was used for mean comparisons. These analyses were performed using the software STATGRAPHIC plus version 5.1 (Statistical Graphics Corporation™, Maryland, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of QTL associated with starch properties

The phenotypic variation of starch, amylose, amylopectin content, swelling power, and gelatinization enthalpy was determined in 103 RIL derived from K0326Y QPM and W64Ao2 (Table 2). A continuous variation was observed in the RIL population for every trait studied, and the extreme values were outside of those from the parental lines, indicating transgressive segregation. Composite interval mapping identified 26 QTL, which explained 66% of the total variation for the starch properties (Table 3). For total starch, five loci were identified on chromosomes 1 (qST-1), 4 (qST-4), 5 (qST-5), 7 (qST-7), and 10 (qST-10); the alleles contributing to this trait were mainly from K0326Y QPM, except for two loci contributed by the W64Ao2 alleles. Similar chromosomal locations associated with QTLs for starch content have been reported in different maize germplasm (Séne *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2015).

Five QTLs were identified for amylose content (Table 3), and the favorable alleles came from K0326Y QPM. These loci were also identified for amylopectin content but in this case, the positive additive effect corresponded to alleles from W64Ao2 (high amylopectin). The major QTLs for these traits were in bins 3.05-3.06 (qAM-3, qAP-3), 7.02 (qAM-7, qAP-7), and 9.03-9.04 (qAM-9, qAP-9), explaining 47 % of the observed variation. The loci on chromosomes 1, 7, and 9 coincided with the QTL reported by Holding *et al.* (2011) for traits associated with *o2* endosperm modification (vitreousness, density, and hardness) in the same RILs. A significant correlation was observed between amylose content and vitreousness in the RIL population ($r = 0.52$, $p < 0.01$).

Five QTL were identified for starch swelling power (SP) on chromosomes 1 (qSP-1), 2 (qSP-2), 5 (qSP-5), 7 (qSP7), and 9 (qSP-9) (Table 3), highlighting qSP-9 that explains 23 %

Tabla 2. Variabilidad de propiedades fisicoquímicas de almidón en endospermo maduro de K0326Y QPM, W64Ao2 y líneas recombinantes puras (RIL) derivadas de su cruce.

Table 2. Variability of starch physicochemical properties in mature endosperm of K0326Y QPM, W64Ao2 and recombinant inbred lines (RIL) derived from their cross.

Property	K0326Y QPM	W64Ao2	RILs
Total starch (mg /100 mg flour)	74.00 ± 0.80 ^a	75.00 ± 0.80 ^a	63.21 - 76.79
Amylose (mg /100 mg starch)	25.54 ± 1.06 ^a	21.79 ± 0.49 ^b	15.56 - 32.29
Amylopectin (mg /100 mg starch)	74.46 ± 1.06 ^b	78.21 ± 0.49 ^a	67.71 - 89.91
Swelling power (g /g flour)	7.19 ± 0.01 ^b	9.22 ± 0.08 ^a	5.89 - 10.09
Gelatinization enthalpy (J/g)	10.35 ± 0.13 ^b	11.54 ± 0.52 ^a	8.14 - 13.41

Different superscript letters between the parental lines K0326Y QPM and W64Ao2 indicate significant differences based on the Fisher test (P<0.05).

of the variation. The qSP-1, qSP-7, and qSP-9 loci coincided with those identified for amylose (Table 3) and vitreousness (Holding *et al.*, 2011). Alleles from W64Ao2 (*soft endosperm*) contributed to the variation, which corresponds with the high SP and low amylose values of this parental line and the inverse correlation observed for these traits in the RILs ($r = -0.413$, $p < 0.01$). SP is frequently used as an indirect measure of water uptake during starch gelatinization (Konik-Rose *et al.*, 2001) and is influenced by the granule composition. The asymmetric distribution of amylopectin molecules favors the entry of water and thereby the swelling power, whereas amylose can form amylose-lipids complexes that inhibit swelling (Tester and Morrison, 1990).

Four of the six QTL identified for gelatinization enthalpy were coincident with those for SP on chromosomes 1 (qGE-1.2), 2 (qGE-2), 7 (qGE-7), and 9 (qGE-9), which together explained 51 % of the ΔHG variation (Table 3). Similar to SP, loci on chromosomes 7 and 9 were coincident with those

Tabla 3. Características de QTLs asociados con propiedades del almidón.

Table 3. Characteristics of QTLs associated with starch properties.

Trait	QTL	Bin	Left-Right markers	LRS	Variance	Effect*
Total starch	qST-1	1.07-1.08	Umc1278-Dupssr12	12.2	11	-0.96
	qST-4	4.04-4.05	Mmc0471-BnlG1937	13.8	14	1.02
	qST-5	5.03-5.04	Umc1056-BnlG2323	12.7	12	-0.96
	qST-7	7.04	Umc1029-Umc1944	12.2	11	0.86
	qST-10	10.04-10.06	Umc1053-Umc2190	12.7	11	-0.99
Amylose	qAM-1	1.05-1.06	Umc1076-Umc1335	11.3	9	-1.14
	qAM-3	3.05-3.06	Umc1167-BnlG197	15.6	14	-1.32
	qAM-5	5.04-5.05	BnlG2323-Mmc0081	13.0	12	-1.29
	qAM-7	7.02	Umc1036-γ zein	19.6	19	-1.65
	qAM-9	9.03-9.04	BnlG127-Umc1771	16.4	14	-1.27
Amylopectin	qAP-1	1.05-1.06	Umc1076-Umc1335	11.3	9	1.14
	qAP-3	3.05-3.06	Umc1167-BnlG197	15.6	14	1.32
	qAP-5	5.04-5.05	BnlG2323-Mmc0081	13.0	12	1.29
	qAP-7	7.02	Umc1036-γ zein	19.6	19	1.65
	qAP-9	9.03-9.04	BnlG127-Umc1771	16.4	14	1.27
SP	qSP-1	1.05-1.06	Umc1076-Umc1335	12.8	12	0.30
	qSP-2	2.08-2.09	Umc1516-Umc1551	11.7	10	0.28
	qSP-5	5.05	Umc1264-BnlG278	11.9	10	0.31
	qSP-7	7.02	Umc1036-γ zein	23.7	12	0.39
	qSP-9	9.03	Wx1-BnlG127	28.5	23	0.43
ΔHG	qGE-1.1	1.03	BnlG176-BnlG439	19.3	16	0.42
	qGE-1.2	1.05-1.06	Umc1076-Umc1335	10.7	9	0.41
	qGE-2	2.08-2.09	Umc1516-Umc1551	13.6	12	0.41
	qGE-5	5.08-5.09	Umc1225-Umc1153	11.0	10	0.36
	qGE-7	7.02	Umc1036-γ zein	11.8	11	0.40
	qGE-9	9.03	Wx1-BnlG127	14.9	13	0.47

LRS, likelihood ratio statistic. *The additive effect is negative for the K0326Y-QPM allele and positive for the W64Ao2 allele. SP, Swelling power. ΔHG, Gelatinization enthalpy.

previously reported for amylose (Table 3) and vitreousness (Holding *et al.*, 2011); the W64Ao2 alleles contributed to the ΔHG variation, which corresponded with the higher gelatinization enthalpy observed for this parental line (Table 2). Gelatinization enthalpy has been used as a measure of starch crystallinity, which is related to the content of amylopectin (Matveev *et al.*, 2001).

Candidate genes for the QTLs were proposed based on their proximity to flanking markers in the Maize Genome Database (<https://www.maizegdb.org>); co-locations between candidate genes and the QTLs were considered significant when the distances were lower than 10-20 cM (Séne *et al.*, 2001). The flanking markers of QTLs for starch content and composition on bins 4.05 (Bnlg1937) and 5.04 (Bnlg2323) were found near *Brittle-2* (*Bt2*) and *Amylose extender-1* (*Ae1*) genes, respectively. *Bt2* encodes for the small subunit of ADP glucose pyrophosphorylase and *Ae1* for starch branching enzyme IIb (SBEII). The QTL on bin 9.03 (Wx1-Bnlg127) corresponds to the waxy gene (*Wx1*), which encodes for the GBSSI enzyme, responsible for the synthesis of amylose in the starch granule (Denyer *et al.*, 2001).

The QTL on chromosome 7 (Umc1036-γ zein) was located in a locus corresponding to the 27-kDa γ-zein, which was previously reported for vitreousness, hardness, and density in the same RIL population (Holding *et al.*, 2011). Transcription factors that regulate zein genes also appear to control starch synthesis (Zhang *et al.*, 2016). A QTL on chromosome 1 was observed for all traits, but its effect is unclear since no candidate genes affecting starch properties were identified close to this locus; however, the flanking marker in bin 1.05 (Umc1076) is close to a gene for 19 kDa α-zein (*az19D1*). Salazar-Salas *et al.* (2014) reported higher levels of 19 kDa α-zein in vitreous than opaque lines and a highly significant correlation ($r = 0.75$, $p < 0.01$) between the

contents of this protein and those of 27 kDa γ-zein in the RIL population derived from K0326Y QPM and W64Ao2. Both proteins may be contributing to protein bodies formation and the vitreous phenotype.

Starch composition in developing endosperm of QPM lines contrasting in vitreousness

The starch composition was determined in developing endosperms (30 DAP) of K0326Y QPM, W64Ao2, and six RILs contrasting in kernel vitreousness (Table 4) to investigate its relationship with the expression of starch biosynthesis genes. The starch composition of mature endosperms (50 DAP) was included as a reference. At 30 DAP, total starch ranged from 59.1 to 64.6 %; these values were lower than the 88.9 % reported by Li *et al.* (2007) in B73 maize at the same developmental stage, which could be attributed to differences in genotype, growing conditions and method used for starch isolation. No significant differences were found in total starch content between the parental lines K0326Y QPM and W64Ao2. Pereira *et al.* (2008) reported a similar behavior between an *opaque-2* and a QPM line at 30 DAP. The starch content increased to an average of 75 % in mature endosperms (Table 4).

The amylose content of developing endosperm from K0326Y QPM (20.0 %) was significantly higher ($p \leq 0.05$) than that of W64Ao2 (17.3 %), which corresponded with the higher amylose content observed in the vitreous RIL with respect to the opaque lines (Table 4). The same behavior was observed in the mature endosperm. These results agree with those of Dombrink-Kurtzman and Knutson (1997) and Gayral *et al.* (2015), who observed higher amylose levels in starch from the vitreous region of maize endosperm with respect to starch from the floury area.

Tabla 4. Composición de almidón en endospermo en desarrollo (30 DDP) y maduro (50 DDP) de K0326Y QPM, W64Ao2, y líneas recombinantes puras seleccionadas contrastantes en el genotipo de marcadores que flanquean loci asociados con la modificación del endospermo en QPM.

Table 4. Starch composition in developing (30 DAP) and mature (50 DAP) endosperms of K0326Y QPM, W64Ao2, and selected recombinant inbred lines (RILs) contrasting in the genotype of markers flanking loci associated with endosperm modification in QPM.

Maize line		Starch*		Amylose**		Amylopectin**	
		30 DAP	50 DAP	30 DAP	50 DAP	30 DAP	50 DAP
K0326Y-QPM	V	59.4 ± 1.5 ^d	74.0 ± 0.8 ^c	20.0 ± 0.7 ^a	25.5 ± 1.1 ^a	80.0 ± 0.7 ^c	74.5 ± 1.1 ^e
W64Ao2	O	59.6 ± 1.1 ^{cd}	75.0 ± 0.8 ^{bc}	17.2 ± 0.5 ^b	21.8 ± 0.5 ^b	82.8 ± 0.5 ^b	78.2 ± 0.5 ^d
33	V	61.5 ± 1.4 ^{bc}	77.6 ± 1.2 ^a	16.5 ± 0.4 ^b	21.7 ± 0.4 ^{bc}	83.5 ± 0.4 ^b	78.3 ± 0.4 ^{cd}
338	V	61.0 ± 1.4 ^{bcd}	75.8 ± 1.7 ^b	16.6 ± 0.7 ^b	22.0 ± 0.3 ^b	83.4 ± 0.7 ^b	78.0 ± 0.3 ^d
346	V	62.3 ± 1.3 ^b	75.9 ± 0.6 ^{ab}	17.1 ± 0.4 ^b	21.9 ± 0.5 ^b	82.9 ± 0.4 ^b	78.0 ± 0.5 ^d
55	O	64.6 ± 0.7 ^a	75.7 ± 0.7 ^b	14.2 ± 0.4 ^c	19.9 ± 0.7 ^{de}	85.8 ± 0.4 ^a	80.1 ± 0.7 ^{ab}
73	O	62.5 ± 1.3 ^{ab}	74.9 ± 0.6 ^{bc}	14.6 ± 0.7 ^c	19.5 ± 0.4 ^e	85.3 ± 0.7 ^a	80.5 ± 0.4 ^a
185	O	59.5 ± 1.1 ^d	76.1 ± 0.6 ^{ab}	16.8 ± 0.1 ^b	20.7 ± 0.5 ^{cd}	83.2 ± 0.1 ^b	79.3 ± 0.5 ^{bc}

DAP, Days after pollination; V, vitreous; O, opaque; * Total starch expressed as mg per 100 mg of endosperm flour; ** Amylose and amylopectin expressed as mg per 100 mg of starch. For each property and developmental stage different superscript letters in the same column indicate significant differences between the maize lines based on the Fisher test ($P < 0.5$).

Expression analysis of QTL candidate genes

The molecular basis of QTLs associated with starch properties was investigated by measuring the expression of a 27-kDa γ -zein gene (Fig. 1) and four genes related to starch biosynthesis (*Bt2*, *Wx1*, *Ae1*, and *Zpu1*) (Fig. 2) in the parental lines and six RILs contrasting in vitreousness and the genotype of flanking markers. A late middle stage (30 DAP) of seed development was chosen because the endosperm cells have high levels of gene expression and large amounts of starch and storage proteins that may be associated with

the vitreous phenotype in mature endosperm. The relative expression of the 27-kDa γ -zein gene was significantly higher in K0326Y QPM and the vitreous RIL with respect to W64Ao2 and the opaque lines (Fig. 1A). Holding *et al.* (2011) also observed a higher expression of this gene in vitreous RILs after 18 DAP, indicating very low levels of transcripts for opaque samples as observed in the present study. This expression pattern was confirmed at the protein level in developing (30 DAP) endosperms (Fig. 1B); the mean value of 27-kDa γ -zein was 21.8 % higher in vitreous than opaque RILs. Sethi *et al.*

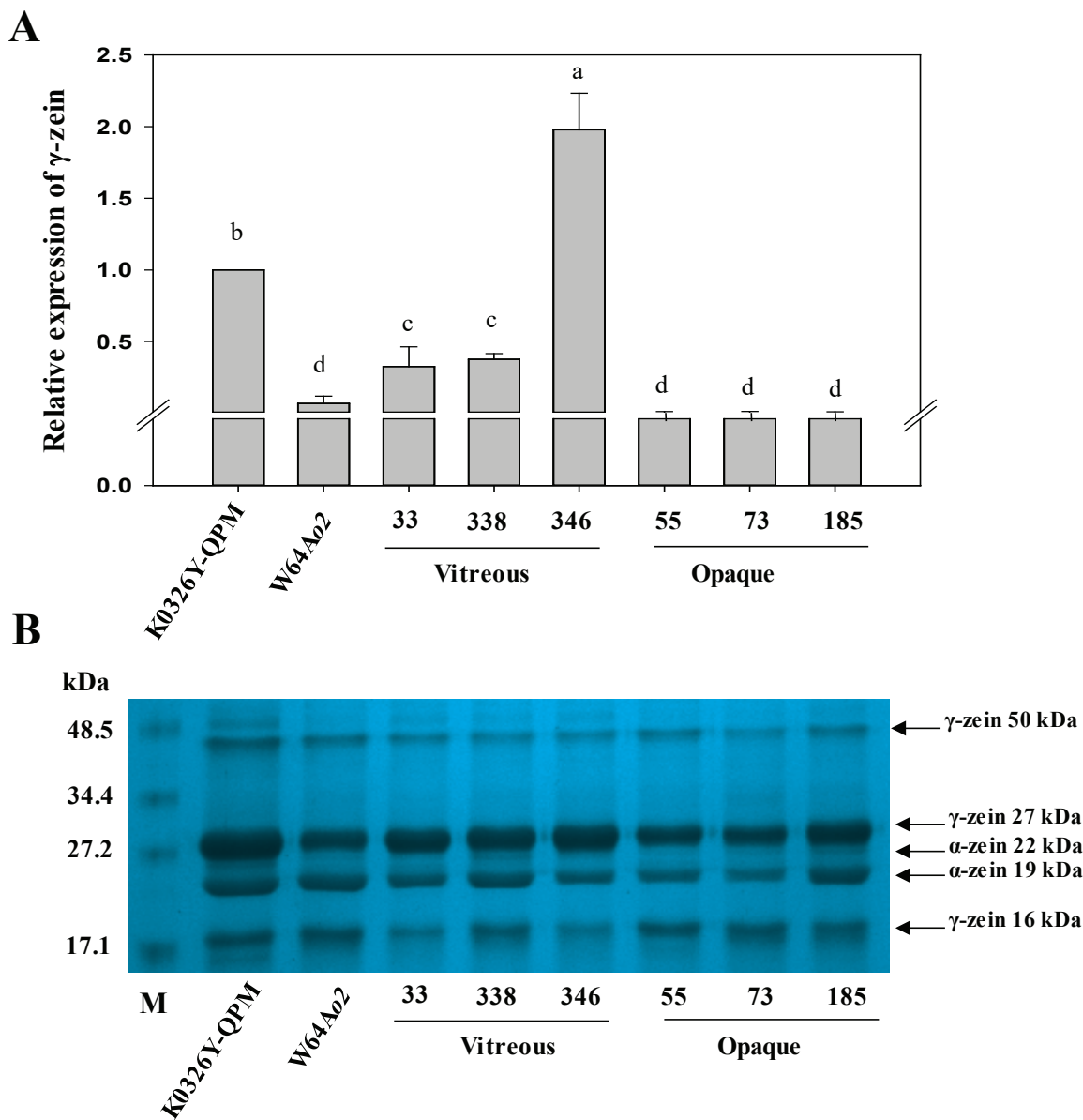


Figura 1. Expresión relativa del gen de γ -zeína y perfil de zeínas en endospermo en desarrollo (30 DDP) de líneas contrastantes en vitreosidad y el genotipo de marcadores que flanquean QTLs para esta característica. (A) Expresión relativa del gen de γ -zeína de 27 kDa. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las líneas de maíz basado en la prueba de Fisher ($P < 0.05$). (B) Separación por SDS-PAGE de zeínas de endospermo en desarrollo (30 DDP). (B). Los marcadores de peso molecular (kDa) se muestran en la izquierda y en la derecha se indican las principales sub-fracciones de zeínas.

Figure 1. Relative expression of γ -zein gene and zein profiles in developing endosperm (30 DAP) of lines contrasting in vitreousness and the genotype of QTLs-flanking markers for this trait. (A) Relative expression of the 27-kDa γ -zein gene. Different letters indicate significant differences between the maize lines based on the Fisher test ($P < 0.05$). (B) SDS-PAGE separation of zein proteins. Molecular weight (kDa) standards are shown on the left, and the main zein sub-fractions are indicated on the right.

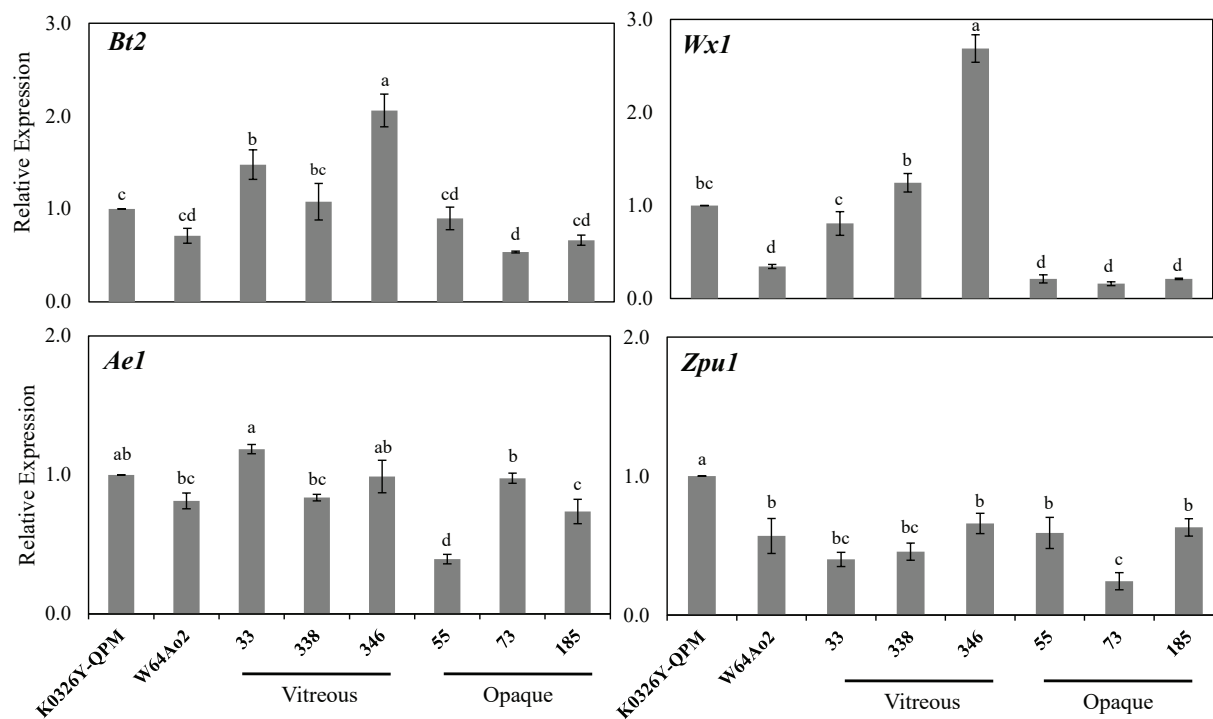


Figura 2. Expresión relativa de genes de síntesis de almidón en endospermo en desarrollo (30 DDP) de líneas de maíz contrastantes en vitreosidad y el genotipo de marcadores que flanquean QTLs para esta característica. El gen de la proteína relacionada a retinoblastoma 1 (*RRB1*) fue usado como referencia y los valores de expresión son relativos al de la línea K0326Y QPM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las líneas de maíz basado en la prueba de Fisher ($P < 0.05$).

Figure 2. Relative expression of starch biosynthesis genes in developing endosperm (30 DAP) of maize lines contrasting in vitreousness and the genotype of QTLs-flanking markers for this trait. The retinoblastoma-related protein-1 (*RRB1*) gene was used as a reference, and the expression values are relative to that of the K0326Y QPM line. Different letters indicate significant differences between the maize lines based on the Fisher test ($P < 0.05$).

(2021) also reported that the prolamin-like fraction that includes 27-kDa γ -zein showed higher accumulation in QPM lines compared to *opaque-2* genotypes after 30 and 45 DAP. Salazar-Salas *et al.* (2014) reported a significant correlation ($r = 0.58$, $p < 0.01$) between the levels of 27-kDa γ -zein and vitreousness in 283 RIL derived from the cross between K0326Y QPM and W64Ao2. These results support the essential role of γ -zein in the vitreous phenotype of Quality Protein Maize (Wu *et al.*, 2010), whose enhanced expression was associated with a duplication at the 27-kDa γ -zein locus (Liu *et al.*, 2016).

The *Bt2* gene encodes for ADP-glucose pyrophosphorylase, a key enzyme in starch biosynthesis (Giroux and Hannah, 1994). The relative expression of this gene was not significantly different between the parental lines K0326Y QPM and W64Ao2 (Fig 2), which corresponded with the similar starch content observed in developing endosperm from these lines (Table 4). There were some differences in *Bt2* expression between the RILs, where the vitreous lines generally showed higher transcript levels than the opaque lines (Fig. 2). The over-expression of *Bt2* (~2.5-fold) was associated with a 7.5 % increase in starch content in developing (30 DAP) maize endosperm (Li *et al.*, 2011). However, the higher transcript levels of *Bt2* observed in some vitreous lines were not associated with significant changes in starch content (Table 4). The *Wx1* gene maps close to the QTL for amylose and amylopectin on chromosome 9 (BnlG127). *Wx1* encodes

for granule-bound starch synthase I (GBSSI), the enzyme responsible for amylose synthesis (Denyer *et al.*, 2001). The *Wx1* expression was three-fold greater in K0326Y QPM than W64Ao2 and eight-fold higher in vitreous than opaque RILs (Fig. 2). These results are in agreement with the higher amylose content observed in K0326Y QPM and the vitreous RIL with respect to W64Ao2 and the opaque RILs (Table 4). The increased expression of *Wx1* may lead to a more significant accumulation and activity of GBSSI that results in the high amylose content associated with the vitreous phenotype.

The *Ae1* gene encodes for the starch branching enzyme IIb (SBEIIb), which catalyzes the formation of the α -1,6 glycosidic bonds during the synthesis of amylopectin (Nishi *et al.*, 2001). Although the amylopectin content, in general, was higher in W64Ao2 and opaque RILs than K0326Y QPM and vitreous RILs (Table 4); there were no significant differences in *Ae1* expression between opaque and vitreous lines at 30 DAP (Fig. 2). However, the expression of this gene was higher in the opaque lines at an earlier stage of endosperm development (20 DAP) (data not shown) and may explain the higher amylopectin content of these lines. Jia *et al.* (2013) also found a higher expression of *Ae1* in W64Ao2 with respect to its normal counterpart W64A⁺ at 22 DAP, which could favor the production of starch granules with larger crystalline regions associated with the opaque phenotype.

The *Zpu1* gene encodes the pullulanase-type starch debranching enzyme, which hydrolyzes the α -1,6 glycosidic bonds of pullulan, a linear polymer of maltotriose units produced during starch metabolism (Nakamura *et al.*, 1996). The expression level of this gene in the endosperm of the parental line W64Ao2 was half of that in K0326Y QPM (Fig. 2), but there were no significant differences between the opaque and vitreous RILs.

Accumulation of starch granule-associated proteins

Starch granule-associated proteins (SGAP) from developing and mature endosperms (Fig. 3, Table 5) were analyzed because the GBSSI-encoding gene (*Wx1*) was found to be differentially expressed between the vitreous and opaque lines. The most abundant protein (~55 kDa) was GBSSI and showed more significant accumulation in developing endosperms from the vitreous lines (Fig. 3), which corresponds with the higher amylose content observed in

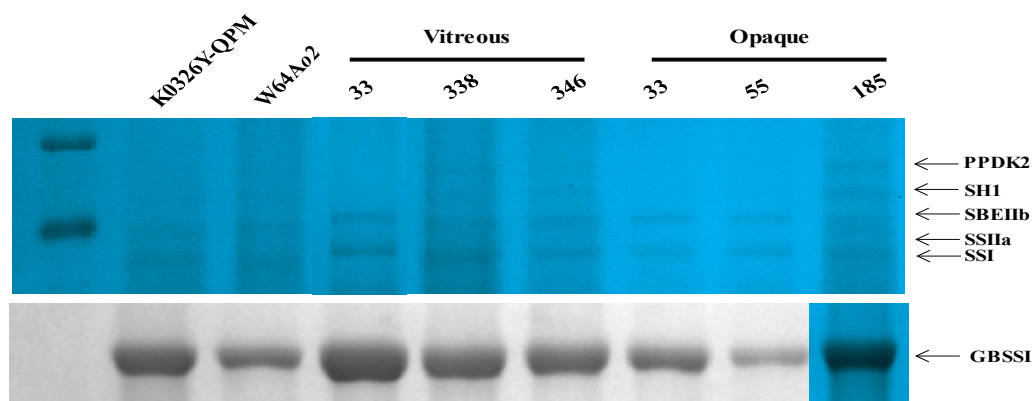


Figura 3. Separación por SDS-PAGE de proteínas asociadas al gránulo de almidón en endospermo en desarrollo (30 DDP) de líneas contrastantes en vitreosidad y el genotipo de marcadores que flanquean QTL asociados con esta característica. Los marcadores de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda y la identidad de las proteínas se indica a la derecha. Las proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas (Tabla 5). GBSSI, Almidón sintasa unida al gránulo; SSI, Almidón sintasa I; SSIIa, Almidón sintasa IIa; SBEIIb, Enzima ramificadora de almidón IIb; SH1, Sacarosa sintasa I; PPDk2, Piruvato fosfato dikinasa 2.

Figure 3. SDS-PAGE analysis of starch granule-associated proteins from developing endosperm (30 DAP) of lines contrasting in vitreousness and the genotype of markers flanking QTLs for this trait. Molecular weight (kDa) standards are shown on the left, and the corresponding proteins are indicated on the right. Protein bands were identified by mass spectrometry (Table 5). GBSSI, Granule-bound starch synthase I; SSI, Starch synthase I; SSIIa, Starch synthase IIa; SBEIIb, Starch branching enzyme IIb; SH1 sucrose synthase 1; PPDk2, Pyruvate phosphate dikinase 2.

Table 5. Identificación por espectrometría de masas de proteínas asociadas al gránulo de almidón.
Table 5. Identification by tandem mass spectrometry of starch granule associated proteins.

Accession No.	Protein name	Theoretical Mw (kDa)	Observed Mw (kDa)	Sequence Coverage (%)	Peptides matched
A9Y0P1	Granule-bound starch synthase [Zea mays]	65.8	63.2	21.52	EALQAEVGLPVDR FSVDCNVVEPADVK FPCGLIQLQGMR
O49064	Starch synthase I [Zea mays]	70.5	75.6	12.3	GAVVTADRIVTVSK EHKSSWEGLMK GIDLIIIPDLMR
Q6RG16	Starch synthase IIa, [Zea mays]	79.9	81.7	9.33	ITAGADVLMPSR MLQHLEREHPNK APRDAALVRAEAEAGGK
O81387	Starch branching enzyme IIb [Zea mays]	90.6	89.6	17.9	VVLDS DAGLFGGFSR KAVMVP EGEN DGLASR FIPGNNSYDKCRR
K7V5Z8	Shrunken1 [Zea mays]	91.7	96.0	10.27	ELANLVIVAGDHGK LLPDAAGTTCGQR VIGTEHTDIIR
K7UZT6	Pyruvate, phosphate dikinase 2 [Zea mays]	96.0	105.6	21.63	EGEWLSLNGSTGEVILGK IAVDMVNEGLVER AWTAFPGSAQEGIGR

these samples (Table 4). The other SGAP corresponded to the enzymes starch synthase I (SSI), starch synthase IIa (SSIIa), starch branching IIb (SBEIIb), sucrose synthase 1 (SH1), and pyruvate phosphate dikinase 2 (PPDK2), which are involved in amylopectin synthesis and starch metabolism. Unfortunately, the low abundance of these proteins did not allow to register differences in accumulation between the vitreous and opaque lines. Other authors previously reported similar SGAP patterns in maize (Grimaud *et al.*, 2008; Juárez-García *et al.*, 2013; Salazar-Salas *et al.*, 2014). PPDK and SH1 form complexes with some starch biosynthetic enzymes like SSIII, SSIIa, SBEIIa, and SBEIIb in maize amyloplasts and they may regulate the carbon partitioning between metabolic pathways (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2009).

CONCLUSIONS

The endosperm modification in QPM is associated with changes in the expression of starch biosynthesis genes, such as *Wx1* that showed higher transcript levels in the endosperm of the vitreous lines (K0326Y QPM, 33, 338, 346), which resulted in a more significant accumulation of GBSSI and consequently the synthesis of starch with a higher proportion of amylose during kernel development. As a result, starch granules with more amorphous regions may favor their packing and association, contributing to the vitreous phenotype. The information about the mechanisms involved in the modification of the *opaque-2* endosperm will facilitate the development of QPM genotypes with better agronomic and processing characteristics.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from CONACYT (167584 and 284552).

REFERENCES

- Churchill, G.A. and Doerge, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138(3):963-971.
- Denyer, K.a.y., Johnson, P., Zeeman, S. and Smith, A.M. 2001. The control of amylose synthesis. *Journal of Plant Physiology* 158:479-487.
- Dombrink-Kurtzman, M.A. and Knutson, C.A. 1997. A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. *Cereal Chemistry* 74(6):776-780.
- Dong, Y., Zhang, Z., Shi, Q., Wang, Q., Zhou, Q. and Li, Y. 2015. QTL identification and meta-analysis for kernel composition traits across three generations in popcorn. *Euphytica* 204:649-660.
- Gayral, M., Bakan, B., Dalgalarondo, M., Elmorjani, K., Delluc, C., Brunet, S., Linossier, L., Morel, M.H. and Marion, D. 2015. Lipid partitioning in maize (*Zea mays* L.) endosperm highlights relationships among starch lipids, amylose, and vitreousness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(13):3551-3558.
- Gibbon, B.C., Wang, X. and Larkins, B.A. 2003. Altered starch structure is associated with endosperm modification in Quality Protein Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 100(26):15329-15334.
- Giroux, M.J. and Hannah, L.C. 1994. ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunken-2* and *brittle-2* mutants of maize. *Molecular and General Genetics* 243(4):400-408.
- Grimaud, F., Rogniaux, H., James, M.G., Myers, A.M. and Planchot, V. 2008. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59(12):3395-3406.
- Hennen-Bierwagen, T.A., Lin, Q., Grimaud, F., Planchot, V., Keeling, P.L., James, M.G. and Myers, A.M. 2009. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: A model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant Physiology* 149(3):1541.
- Holding, D.R., Hunter, B.G., Chung, T., Gibbon, B.C., Ford, C.F., Bharti, A.K., Messing, J., Hamaker, B.R. and Larkins, B.A. 2008. Genetic analysis of *opaque2* modifier loci in quality protein maize. *Theoretical and Applied Genetics* 117(2):157-170.
- Holding, D.R., Hunter, B.G., Klingler, J.P., Wu, S., Guo, X., Gibbon, B.C., Wu, R., Schulze, J.M., Jung, R. and Larkins, B.A. 2011. Characterization of *opaque2* modifier QTLs and candidate genes in recombinant inbred lines derived from the K0326Y quality protein maize inbred. *Theoretical and Applied Genetics* 122(4):783-794.
- Huang, B., Chen, J., Zhang, J., Liu, H., Tian, M., Gu, Y., Hu, Y., Li, Y., Liu, Y. and Huang, Y. 2011. Characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase encoding genes in source and sink organs of maize. *Plant Molecular Biology Reporter* 29(3):563-572.
- Jia, M., Wu, H., Clay, K.L., Jung, R., Larkins, B.A. and Gibbon, B.C. 2013. Identification and characterization of lysine-rich proteins and starch biosynthesis genes in the *opaque2* mutant by transcriptional and proteomic analysis. *BMC Plant Biology* 13(1):60-74.
- Juárez-García, E., Agama-Acevedo, E., Gómez-Montiel, N.O., Pando-Robles, V. and Bello-Pérez, L.A. 2013. Proteomic analysis of the enzymes involved in the starch biosynthesis of maize with different endosperm type and characterization of the starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(11):2660-2668.
- Konik-Rose, C.M., Moss, R., Rahman, S., Appels, R., Stoddard, F. and Master, G.M. 2001. Evaluation of the 40 mg swelling test for measuring starch functionality. *Starch/Stärke* 53:14-20.
- Li, L., Blanco, M. and Jane, J. 2007. Physicochemical properties of endosperm and pericarp starches during maize development. *Carbohydrate Polymers* 67(4):630-639.
- Li, N., Zhang, S., Zhao, Y., Li, B. and Zhang, J. 2011. Over-expression of AGPase genes enhances seed weight and starch content in transgenic maize. *Planta* 233(2):241-250.
- Liu, H., Shi, J., Sun, C., Gong, H., Fan, X., Qiu, F., Huang, X., Feng, Q., Zheng, X., Yuan, N., Li, C., Zhang, Z., Deng, Y., Wang, J., Pan, G., Han, B., Lai, J. and Wu, Y. 2016. Gene duplication confers enhanced expression of 27-kDa γ -zein for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 113(18):4964-4969.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta c(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Manly, K.F., Cudmore, R.H., Jr. and Meer, J.M. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12(12):930-932.

- Matveev, Y.I., Van Soest, J.J.G., Nieman, C., Wasserman, L.A., Protserov, V.A., Ezernitskaja, M. and Yuryev, V.P. 2001. The relationship between thermodynamic and structural properties of low and high amylose maize starches. *Carbohydrate Polymers* 44:151-160.
- Mertz, E.T., Bates, L.S. and Nelson, O.E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280.
- Nakamura, Y., Umemoto, T., Ogata, N., Kuboki, Y., Yano, M. and Sasaki, T. 1996. Starch debranching enzyme (R-enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene. *Planta* 199(2):209-218.
- Nishi, A., Nakamura, Y., Tanaka, N. and Satoh, H. 2001. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiology* 127(2):459-472.
- Pereira, R., Davide, L., Pedrozo, C., Carneiro, N., Souza, I. and Paiva, E. 2008. Relationship between structural and biochemical characteristics and texture of corn grains. *Genetics and Molecular Research* 7(2):498-508.
- Salazar-Salas, N.Y., Pineda-Hidalgo, K.V., Chavez-Ontiveros, J., Gutierrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., Bello-Pérez, L.A., Larkins, B.A. and Lopez-Valenzuela, J.A. 2014. Biochemical characterization of QTLs associated with endosperm modification in quality protein maize. *Journal of Cereal Science* 60(1):255-263.
- Séne, M., Thévenot, C., Hoffmann, D., Bénétrix, F., Causse, M. and J.-L., P. 2001. QTLs for grain dry milling properties, composition and vitreousness in maize recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 102:591-599.
- Sethi, M., Singh, A., Kaur, H., Phagna, R.K., Rakshit, S. and Chaudhary, D.P. 2021. Expression profile of protein fractions in the developing kernel of normal, Opaque-2 and quality protein maize. *Scientific Reports* 11(1):2469.
- Tester, R.F. and Morrison, W.R. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chemistry* 67:551-557.
- Villegas, E., Vasal, S.K., Bjarnason, M. and Mertz, E.T. 1992. Quality protein maize-what is it and how was it developed. En: *Quality Protein Maize*. E.T. Mertz (Ed), p. 27-48. American Society of Cereal Chemists, Saint Paul, Minnesota.
- Wallace, J., Lopes, M., Paiva, E. and Larkins, B.A. 1990. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified *opaque-2* maize. *Plant Physiology* 92:191-196.
- Wu, Y., Holding, D.R. and Messing, J. 2010. γ -zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 107(29):12810-12815.
- Zeng, Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1468.
- Zhang, J., Lu, X., Song, X., Yan, J., Song, T., Dai, J., Rocheford, T. and Li, J. 2008. Mapping quantitative trait loci for oil, starch, and protein concentrations in grain with high-oil maize by SSR markers. *Euphytica* 162:335-344.
- Zhang, Z., Zheng, X., Yang, J., Messing, J. and Wu, Y. 2016. Maize endosperm-specific transcription factors O2 and PBF network the regulation of protein and starch synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 113(39):10842-10847.

Identificación de rizobacterias aisladas de *Tagetes coronopifolia* y *Tagetes terniflora* (Cempasúchitl) y evaluación de su capacidad inhibitoria *in vitro* contra microorganismos fitopatógenos

Identification of rhizobacteria isolated from *Tagetes coronopifolia* and *Tagetes terniflora* (Marigold) and evaluation of their *in vitro* inhibitory capacity against phytopathogenic microorganisms

Castillo-Ortega LS, Mercado-Flores Y, Téllez-Jurado A, Anducho-Reyes MA*

Laboratorio de Agrobiotecnología, Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, carretera Pachuca – Cd. Sahagún, km. 20, Rancho Luna, Ex Hacienda de Sta. Bárbara, C.P. 43830. Zempoala, Hidalgo, México.

RESUMEN

El género *Tagetes* representa un grupo de plantas conocidas comúnmente como cempasúchil o flor del muerto, las cuales son reconocidas principalmente por su uso en la industria alimentaria, horticultura ornamental, terapéutico herbolario y cultural. *Tagetes coronopifolia* y *terniflora* son dos especies de este género, empleadas en la rotación de cultivos para el control de nemátodos fitopatógenos. En este trabajo se aislaron 581 cepas de rizobacterias a partir de suelo rizosférico, suelo adherido a la superficie de la raíz y el interior de la raíz de la planta a los 30, 60, 90 y 120 días de crecimiento en cultivos de invernadero. Del total de cepas aisladas de rizobacterias, 22 presentaron actividad antagonista contra *Fusarium* sp., 53 contra *Stenocarpella maydis*, ambos hongos patógenos de maíz, mientras que 37 cepas mostraron antagonismo contra la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiguenses* subsp. *michiganensis*. De acuerdo con el porcentaje de inhibición de los patógenos en estudio, se seleccionaron 10 rizobacterias para la identificación molecular de una secuencia parcial del gen ADN_r 16S. Las secuencias parciales de cada rizobacteria fueron analizadas por similitud en el GenBank mostrando como resultado que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, los cuales son utilizados como agentes de biocontrol.

Palabras clave: rizobacterias, bacterias endófitas, control biológico, plantas antagonistas.

ABSTRACT

The genus *Tagetes* represents a group of plants commonly known as marigold or "flower of the dead", which are mainly recognized for their use in the food industry, ornamental horticulture, therapeutic herbalism, and culture. *Tagetes coronopifolia* and *terniflora* are two plant species of this genus, which are used for crop rotation and control of phytopathogenic nematodes. In this work, 581 rhizobacteria strains were isolated from samples of rhizosphere soil, soil attached to the root surface and inside of plant root at 30, 60, 90 and 120 days of growth in greenhouse cultures. Twenty-two strains showed antagonistic activity against *Fusarium* sp. and 53 against *Stenocarpella maydis*, which are pathogenic fungi in corn, while 37 strains showed antagonism against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. According

to the percentage of inhibition of the phytopathogens, 10 rhizobacteria were selected for molecular identification of the partial 16S rDNA gene. The partial sequences of each rhizobacteria were analyzed for similarity in the GenBank, showing as a result that they belong to the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera, which are used as biocontrol agents.

Keywords: rhizobacteria, endophytic bacteria, biological control, antagonistic plants.

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Tagetes* L. (familia Asteraceae) se clasifican taxonómicamente en 53 especies herbáceas anuales y perennes. Son nativas de América y varias de sus especies silvestres tienen una amplia distribución geográfica desde el suroeste de Estados Unidos hasta Argentina (Loockerman *et al.*, 2003; Cicevan *et al.*, 2016). En México, se estima que habitan alrededor del 50% de las especies, además de considerarse como su centro geográfico de origen y diversidad (García-Sánchez *et al.*, 2012).

Varias especies de estas plantas son agroeconómicamente importantes, debido a su uso en la industria alimentaria, horticultura ornamental, terapéutico herbolario y cultural (García-Sánchez *et al.*, 2012). Adicionalmente, también han adquirido importancia en el ámbito del control biológico, debido a que el conocimiento empírico y de investigación han demostrado que algunas especies de estas plantas en crecimiento (Miller y Ahrens, 1969), sus residuos vegetales (Siddiqui y Alam, 1987) o los extractos de sus raíces (Hoan y Davide, 1979), son eficaces para controlar y reducir significativamente las poblaciones de nemátodos (Hooks *et al.*, 2010), hongos (Mares *et al.*, 2004) y bacterias (Gakuubi *et al.*, 2016) fitopatógenas en suelo, tanto en condiciones de invernadero y campo abierto (Topp *et al.*, 1998; Sturz y Kimpinski, 2004). Esta propiedad de control biológico se relaciona con la actividad alelopática de diversos metabolitos secundarios como acetilenos, carotenoides, flavonoides, terpenoides, alcaloides y tiofenos (Salehi *et al.*, 2018), que son producidos y contenidos en flores, hojas, tallos, raíz y exudados. No obstante a esta actividad antagonista y sus exudados rizosféricos, un fenómeno interesante y poco estudiado ha sido que estos metabolitos secundarios modifican relativamente la densidad total y la biomasa de las poblaciones microbianas autóctonas en la

rizosfera de estas plantas (Qu *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2022), argumentándose inclusive, que estos compuestos alelopáticos podrían inducir un proceso de mitigación microbiana o exacerbación reducida para moldear el microbioma rizosférico (Siebers *et al.*, 2018; David *et al.*, 2018). Estas interacciones positivas, entre rizobacterias y su planta huésped, podrían ser una alternativa para la búsqueda, aislamiento, identificación y uso de bacterias que contribuyan a la supresión natural o inducida de enfermedades transmitidas por diversos microorganismos fitopatógenos en suelo y por consecuencia, mejorar la salud vegetal (Zuo *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2019), con lo cual, se aseguraría el rendimiento competitivo de los cultivos y se garantizaría la protección y seguridad ambiental para mantener el equilibrio ecológico a largo plazo en los agroecosistemas (Majeed *et al.*, 2018).

Bajo este contexto, en este trabajo, se emplearon las plantas alelopáticas *T. coronopifolia* y *T. terniflora* con el objetivo de aislar y caracterizar morfológicamente bacterias nativas de su rizósfera, para posteriormente evaluar *in vitro* su potencial antagónico contra los microorganismos fitopatógenos del maíz *S. maydis*, *Fusarium* sp., y la bacteria patógena de jitomate *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). Finalmente, las cepas con potencial antagonista se identificaron molecularmente mediante el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de plantas en condiciones de invernadero

La germinación de las dos especies de *Tagetes* se realizó con 10 a 12 semillas sobre soportes de papel filtro estéril humedecidos con agua destilada estéril y en bases de cajas de Petri (100 x 15 mm). Las bases de cajas Petri se colocaron sobre una charola de plástico con algodones humedecidos con una solución de glicerol al 50 % y cubierta con papel celofán. Las semillas, bajo estas condiciones, se expusieron a la luz solar natural durante 12 h a temperatura ambiente, hasta la germinación. Una vez observado el brote en cada una de las semillas, se contaron 14 días para posteriormente sembrar las plántulas en macetas de 50 cm de diámetro y 45 cm de alto a $\frac{3}{4}$ de su capacidad con suelos con cargas microbianas disminuidas por un proceso de esterilización a 121 °C y 15 lb por 1 h, el cual se repitió tres veces cada 24 h y que fueron colectados en un campo experimental de la Universidad Politécnica de Pachuca (N 19°58'50", O 98°41'06", 2,375 msnm). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero durante los 120 días de muestreo. Las semillas de *T. coronopifolia* y *T. terniflora* fueron donadas por el Dr. Miguel Angel Serrato Cruz, del departamento de Recursos Genéticos y Agricultura Regional de la Universidad Autónoma Chapingo.

Muestreo de suelos rizosféricos y aislamiento de rizobacterias

Se seleccionaron al azar plantas de cada una de las especies de *Tagetes* y se colectó su suelo rizosférico a los 30, 60, 90 y 120 días de su crecimiento, para esto, se utilizó una

espátula estéril, se marcó alrededor del tallo de las plantas seleccionadas un cuadrado de 10 cm por lado y se sacudió para extraer el suelo rizosférico y obtener las raíces de la planta. El material biológico, se colocó en bolsas de poliestireno estériles y se almacenaron a -78 °C. Tres diferentes zonas fueron empleadas para el aislamiento de las rizobacterias; i) suelo rizosférico; ii) suelo adherido a la superficie de la raíz y iii) el interior de la raíz de la planta. La metodología empleada para la primera zona consistió en pesar y mezclar 10 g de suelo rizosférico en 90 ml de solución de peptona y fosfato buffer salino (K_2HPO_4 , 1.21 g; KH_2PO_4 , 0.34 g, 1000 mL de H_2O destilada, pH 7.4). Para la segunda zona, se pesaron 10 g de raíces de cada una de las plantas seleccionadas y se colocaron en solución de peptona y fosfatos con agitación vigorosa por 10 min. En la tercera zona se pesaron 5 g de raíces de cada una de las plantas y se lavaron tres veces con agua destilada estéril, después se colocaron en una solución de etanol al 70 % (v/v) durante 5 min, y pasado este tiempo, se sumergieron en una solución de NaClO al 6.25 % (v/v) durante 10 min, seguido de 15 s en una solución de H_2O_2 al 10 % (v/v). Las raíces se enjuagaron de 3 a 4 veces con agua destilada estéril y se trituraron en mortero estéril con una solución de $MgSO_4$ 0.01 M, para finalmente diluirse hasta un volumen de 100 mL con solución de $MgSO_4$ 0.01 M. De las soluciones que contenían el suelo rizosférico, las raíces y el macerado de las raíces se hicieron diluciones seriadas de 10^{-2} hasta 10^{-8} para tomar 100 μ L de cada una y sembrarlas por extensión en medio de agar King B y agar Tryptocaseina y Soya (DIBACO). Las placas se incubaron a $28 \pm 2^\circ C$ durante 48 h. Cuando se observó crecimiento bacteriano de las muestras colectadas y procesadas de las dos especies de *Tagetes* en las diferentes zonas y a los 30, 60, 90 y 120 días de su crecimiento, las colonias con morfotipos diferente se aislaron por resiembra hasta obtener cultivos axénicos. Una vez puros, se realizó la caracterización morfológica, microscópica y tinción de Gram. Finalmente, las rizobacterias se conservaron a -20 °C en 0.5 mL de caldo Tryptocaseina y Soya (MP biomedical) y 0.5 mL de glicerol al 50 % estéril (v/v). La nomenclatura utilizada para identificar cada una de las cepas aisladas constó de un código alfanumérico de cinco caracteres. El primer carácter representó el tiempo de muestreo en días para cada especie, *T. coronopifolia* (8:30, 4:60, 2:90, 6:120), *T. terniflora* (1:30, 3:60, 5:90, 7:120); el segundo carácter indicó el medio de cultivo utilizado para su aislamiento, B: King-B, T:TSA; el tercer carácter indicó la especie de *Tagetes* de aislamiento T:*terniflora*, C:*coronopifolia*; el cuarto carácter indica la zona de muestreo, R: Suelo rizosférico, E: Suelo adherido a la superficie de la raíz, I: Interior de la raíz de la planta; y el último carácter es el número de cepa.

Microorganismos fitopatógenos

La cepa de *Cmm* fue donada por la M. C. Ma. De Lourdes Rodríguez Mejía del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo (Rodríguez-Mejía, 2013). La cepa de *S. maydis* fue donada por el Dr. Daniel Jeffers del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y

Trigo (CIMMyT) (Jeffers, 1995), mientras que la cepa de *Fusarium* sp., fue aislada en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad Politécnica de Pachuca a partir de granos de maíz y mazorcas en pudrición. Los materiales vegetales para el aislamiento de *Fusarium* sp. fueron obtenidos de cultivos de maíz de la localidad de Cinta Larga en el municipio de Mixquiahuala, Hidalgo, México.

Pruebas de enfrentamiento dual para *S. maydis* y *Fusarium* sp.

La selección de las bacterias antagónicas se realizó mediante pruebas de enfrentamiento dual empleando el protocolo descrito por Hernández *et al.* (2010). Las inhibiciones del crecimiento de los hongos fitopatógenos se observaron para *Fusarium* sp., a los 10 días de incubación y para *S. maydis* en un rango de 5 a 7 días de incubación. Las bacterias aisladas de ambas especies de *Tagetes*, en las diferentes zonas y a los 30, 60, 90 y 120 días de su crecimiento que generaron un halo de inhibición, fueron seleccionadas y sometidas a pruebas confirmativas por triplicado siguiendo la metodología antes descrita y midiendo los halos de inhibición en mm. El índice de inhibición se estimó empleando la siguiente ecuación, Porcentaje de Inhibición (%) = $(C-E)/C \times 100$, en donde, C es el crecimiento radial del fitopatógeno en el control (mm) y E representa el crecimiento radial del fitopatógeno en el tratamiento (mm).

Pruebas de enfrentamiento dual para *Cmm*

Las pruebas de enfrentamiento dual para la cepa *Cmm* se realizaron con la técnica de difusión en agar modificada de Reinoso *et al.* (2006). Las bacterias aisladas de las diferentes zonas en ambas especies de *Tagetes* y a los 30, 60, 90 y 120 días de su crecimiento que presentaron un halo de inhibición, se seleccionaron y se sometieron a pruebas confirmativas por triplicado de enfrentamiento dual en agar nutritivo. En estas pruebas confirmativas, se hizo la difusión de *Cmm* en agar nutritivo, mientras que por separado las rizobacterias identificadas como antagónicas se crecieron previamente en agar nutritivo durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se cortaron discos de agar de 7 mm de diámetro y se colocaron sobre el cultivo de *Cmm* para incubarse a 28 °C por 24 - 48 h. En cada uno de los halos de inhibición se midió el radio en mm y se estimó el porcentaje de inhibición.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico de cada una de las rizobacterias con capacidad inhibitoria fue extraído a partir de la biomasa de cultivos en caldo nutritivo (BD Bioxon, México) incubados a 28 °C durante 24 h. Las rizobacterias se concentraron por centrifugación a 12000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y de la pastilla celular se obtuvo el ADN genómico empleando la técnica de CTAB modificada de von der Schulenburg *et al.* (2001). Las condiciones de amplificación por PCR del gen ADNr16S parcial fueron las propuestas por Lane (1991) en un volumen total de 50 µL y con los primers universales 8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492R:

5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'. Los productos de PCR se purificaron con el kit comercial PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados se secuenciaron en ambas cadenas con los iniciadores universales 8F y 1492R, utilizando el servicio externo que ofrece el Colegio de Posgraduados con un secuenciador de 4 capilares 3130 Genetic Analyzer Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Una vez obtenidas las secuencias parciales estas fueron editadas manualmente en los programas Chromas v.2.6.6 (Technelysium; <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y BioEdit v.7.0.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) y analizadas por similitud con el algoritmo BLASTN en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso del ON088984 al ON088993.

Análisis estadístico

El análisis del efecto de las variables, tiempo de crecimiento de las plantas, las diferentes zonas de aislamiento de rizobacterias y la especie de la planta se realizó mediante una prueba de independencia con Ji-cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de Rizobacterias

Un total de 581 rizobacterias fueron aisladas, de las cuales, 274 cepas se obtuvieron de la rizosfera de *T. coronopifolia*, mientras que 307 se aislaron de *T. terniflora*. La Tabla 1, muestra el número de bacterias conforme a la zona de aislamiento, la especie y edad de la planta. López-López *et al.* (2017) analizaron mediante técnicas de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) los perfiles moleculares de las comunidades bacterianas rizosféricas de *Tagetes terniflora*, *T. remotiflora* y *T. coronopifolia* a los 3, 30, 60 y 90 días, utilizando muestras de suelo rizosférico en condiciones de invernadero. Los resultados de los índices de diversidad (Shannon's index) indicaron una disminución de la diversidad bacteriana conforme se incrementaba el tiempo, mientras que, respecto a la especie de la planta, la mayor diversidad se observó en *T. terniflora* (López-López *et al.*, 2017). En general, varios trabajos de investigación, relacionados con el estudio de la estructura poblacional microbiana rizosférica, indican que la raíces de las plantas mantienen una interacción directa con las comunidades microbianas, es decir, la secreción de exudados rizosféricos o rizodepósitos, los cuales contienen iones solubles en agua, compuestos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, flavonoides, proteínas, ácidos grasos, antimicrobianos, nematocidas y otros metabolitos secundarios, así como compuestos de alto peso molecular, que incluyen carbohidratos, proteínas, lípidos, mucílagos insolubles y restos de células lisadas o muertas influyen directa y específicamente en la estructura y función de estas comunidades microbianas (Doornbos *et al.*, 2012; Haldar y Sengupta, 2015). Adicionalmente, la edad y genotipo de la planta, así como otros factores bióticos y abióticos, influyen

Tabla 1. Número de bacterias aisladas de la rizosfera de *T. coronopifolia* y *T. terniflora*, de acuerdo con la especie, edad de cada planta y las diferentes zonas de muestreo.

Table 1. Number of bacteria isolated from *T. coronopifolia* and *T. terniflora* rhizosphere, according with the species, age of each plant and different sampling areas.

TIEMPO (DÍAS)	<i>T. coronopifolia</i>			<i>T. terniflora</i>		
	Zonas de aislamiento			Zonas de aislamiento		
	SUELO RIZOSFÉRICO	SUELO ADHERIDO A LA SUPERFICIE DE LA RAÍZ	INTERIOR DE LA RAÍZ DE LA PLANTA	SUELO RIZOSFÉRICO	SUELO ADHERIDO A LA SUPERFICIE DE LA RAÍZ	INTERIOR DE LA RAÍZ DE LA PLANTA
30	36	29	8	36	36	10
60	38	29	8	45	26	10
90	36	27	8	36	36	7
120	22	26	7	27	27	11
Total			274			307

en la calidad y cantidad de los rizodepositos e imponen una presión selectiva, generando una distribución no aleatoria en frecuencia, abundancia y funciones de las comunidades microbianas a nivel horizontal como vertical a través del perfil del suelo (Micallef *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013).

Pruebas de enfrentamiento dual

Stenocarpella maydis, *Fusarium sp* y *Cmm*.

Los resultados de las pruebas de enfrentamiento dual *in vitro* permitieron seleccionar 53 cepas de rizobacterias que inhibieron el crecimiento de *S. maydis* así como 22 cepas que inhibieron el crecimiento de *Fusarium sp*. (Figura 1). Sin embargo, una selección más rigurosa permitió identificar cepas con rangos de porcentajes de inhibición entre 70 y 100%. Para *S. maydis* se seleccionaron las cepas 5TTE1 (70.83

%), 5BTI1 (71.67 %), 1BTI2 (72.5 %), 1BTE13 (80.83 %), 2TCE11 (87.5 %), 1BTE9 (88.33 %) y 2BCR17 (100 %), mientras que para *Fusarium sp*. se seleccionaron las cepas 1BTI1 (70.83 %), 1TTE12 (75.00 %), 2TCR14 (75.00 %), 1BTI2 (79.17 %) y 1BTR3 (87.5 %) (Figura 3). Las pruebas de enfrentamiento dual para *Cmm* permitieron identificar 38 cepas con capacidad inhibitoria (Figura 2). Se seleccionaron cepas con rangos de porcentaje de inhibición entre 70 y 100 % y que correspondieron a 6TCR11 (61.67 %), 4TCR11 (78.33 %), 1BTI1 (95.83 %) y 3TTR10 (100 %) (Figura 2).

El análisis de los resultados de la selección de cepas con rangos de porcentaje de inhibición entre 70 y 100 %, demostró con base al criterio de especie de planta, que la mayor cantidad de cepas bacterianas con potencial antagonico se aislaron de la rizosfera de *T. terniflora* (Figura 3a).

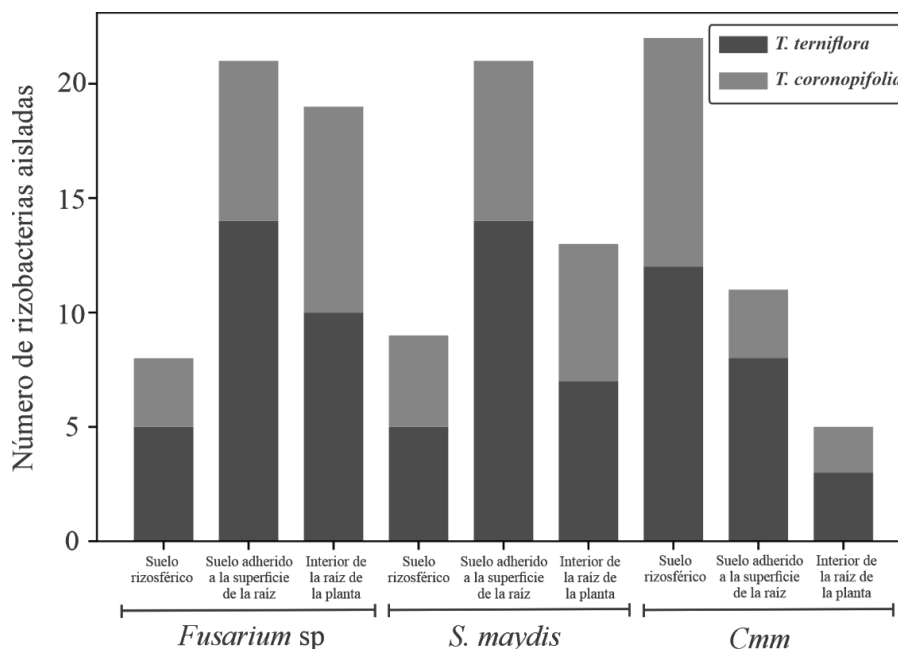


Figura 1. Gráfico de barras apiladas de las bacterias antagonicas aisladas de la rizosfera de *T. coronopifolia* y *T. terniflora* con capacidad inhibitoria de fitopatógenos.

Figure 1. Stacked bar graph of antagonistic bacteria isolated from rhizosphere of *T. coronopifolia* and *T. terniflora* with phytopathogen inhibitory capacity.

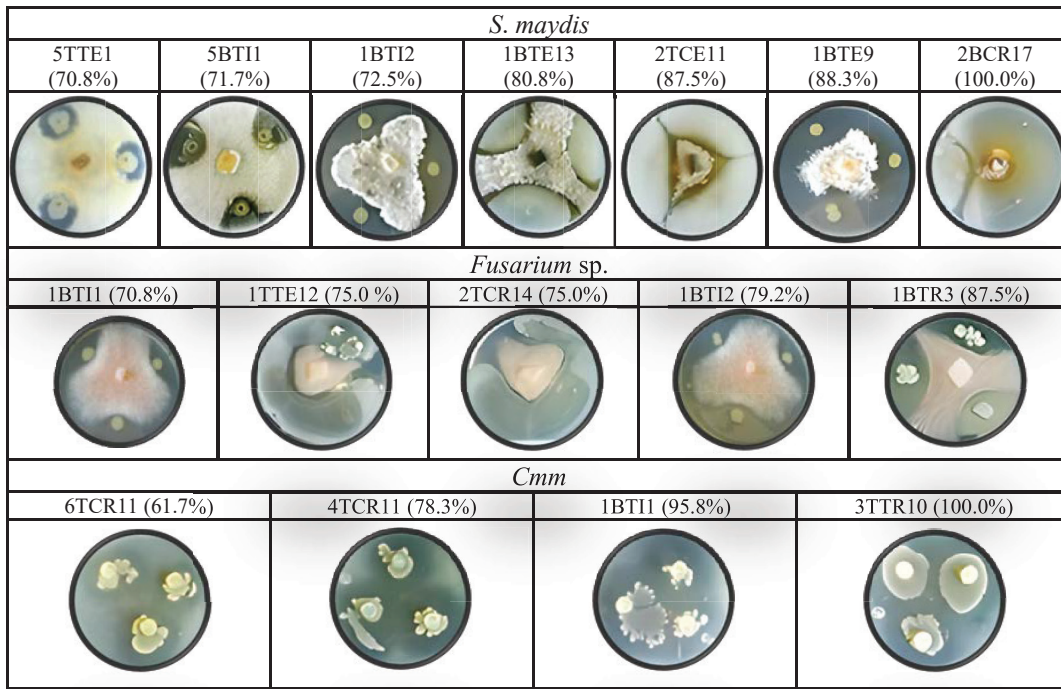


Figura 2. Capacidad antagonística de las bacterias aisladas de la rizósfera de *T. coronopifolia* y *T. terniflora*.
Figure 2. Antagonistic capacity of bacteria isolated from *T. coronopifolia* and *T. terniflora* rhizosphere.

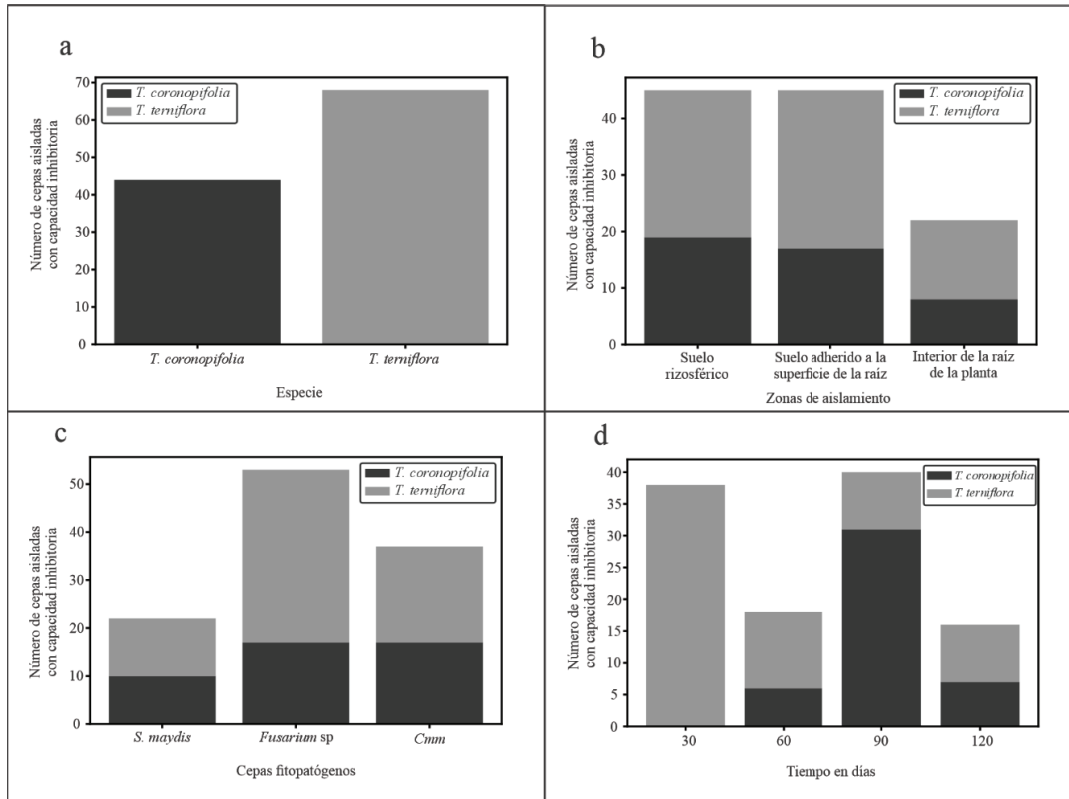


Figura 3. Número de rizobacterias con potencial antagonístico frente a los patógenos *Fusarium sp.*, *S. maydis* y *Cmm*; a) Número de bacterias antagonísticas de acuerdo con la especie de la planta; b) número de bacterias de acuerdo con las tres diferentes zonas de aislamiento de las rizobacterias; c) número de bacterias antagonísticas de acuerdo con el criterio de especie de planta y el fitopatógeno en estudio; d) número de bacterias de acuerdo con el tiempo de crecimiento de la planta.

Figure 3. Number of rhizobacteria with antagonistic potential against the pathogens *Fusarium sp.*, *S. maydis* and *Cmm*; a) Number of antagonistic bacteria according to plant species; b) number of bacteria from the three different zones of rhizobacteria isolation; c) number of antagonistic bacteria according to criteria of plant species and the phytopathogens under study; d) number of bacteria according to the growth time of the plant.

Asimismo, considerando las zonas de aislamiento y tiempo de crecimiento, sin importar la especie de la planta, la mayor cantidad de bacterias antagonicas se obtuvieron del suelo rizosférico y del suelo adherido a la superficie de la raíz (Figura 3b) y a los 30 y 90 días de crecimiento (Figura 3d). Finalmente, las rizobacterias antagonicas presentaron mayor eficiencia de inhibición sobre el hongo fitopatogénico *Fusarium* sp., en comparación con el hongo *S. maydis* (Figura 3c).

Las pruebas de independencia de Ji-cuadrada para los enfrentamientos duales entre fitopatogénos y rizobacterias, considerando las variables, especie de planta, el tiempo de crecimiento de la planta y las tres diferentes zonas de aislamiento de las rizobacterias, demostraron que la capacidad inhibitoria de los aislados obtenidos de *T. coronopifolia* y *terniflora* fueron estadísticamente significativas para aceptar la hipótesis nula (H_0) "el tiempo de crecimiento de la planta y el sitio de aislamiento de las rizobacterias con capacidad inhibitoria son independientes" (*Fusarium* sp., $p = 0.001809$; *S. maydis*, $p = 2.44E-05$; *Cmm*, $p = 0.001057$).

Identificación molecular de las rizobacterias con capacidad inhibitoria de fitopatogénos.

Empleando criterios de selección más rigurosos, que implicaron mayores porcentajes de inhibición hacia *Cmm* y la inhibición hacia uno o ambos hongos fitopatogénos, se logró elegir a 10 rizobacterias (Figura 4), de las cuales, seis cepas fueron aisladas de *T. terniflora* a los 30, 60, 90 y 120 días de suelo rizosférico y adherido a la superficie de la raíz, así como del interior de la raíz y 4 cepas fueron aisladas de *T. coronopifolia* a los 60, 90 y 120 días de suelo adherido a la superficie de la raíz e interior de la raíz. Un análisis de similitud de las secuencias ADNr 16S obtenidas de las 10 rizobacterias, empleando el algoritmo BLASTN del NCBI, demostró que 7 secuencias se alineaban con cepas del género *Bacillus*, específicamente las cepas 2TCI1, 5TTE1, 7TTE11 y 1BTE9 a la especie *subtilis*, las cepas 2BCR17 y 4TCE16 a la especie *B. amyloliquefaciens*, mientras que la cepa 6TCE22 correspondió a la especie *B. atrophaeus* (Tabla 2). Las tres secuencias restantes, se alinearon con cepas del































Rizobacteria	<i>S. maydis</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Cmm</i>
1BTE9	 P.I.: 88.3 ± 6.3	 P.I.: 0.0	 P.I.: 37.5 ± 0.0
1BT11	 P.I.: 54.1 ± 9.0	 P.I.: 70.8 ± 7.2	 P.I.: 95.8 ± 7.3
1BT12	 P.I.: 72.5 ± 2.5	 P.I.: 79.2 ± 16.3	 P.I.: 51.7 ± 10.13
2BCR17	 P.I.: 100.0 ± 0.0	 P.I.: 62.5 ± 0.0	 P.I.: 0.0
2TCI1	 P.I.: 62.5 ± 12.5	 P.I.: 64.2 ± 10.1	 P.I.: 0.0
3TTR11	 P.I.: 52.5 ± 4.0	 P.I.: 51.2 ± 7.2	 P.I.: 100.0 ± 0.0
4TCE16	 P.I.: 26.7 ± 9.5	 P.I.: 0.0	 P.I.: 28.3 ± 1.4
5TTE1	 P.I.: 70.8 ± 2.9	 P.I.: 54.2 ± 7.2	 P.I.: 0.0
6TCE22	 P.I.: 21.7 ± 1.4	 P.I.: 0.0	 P.I.: 28.3 ± 1.4
7TTE11	 P.I.: 65.8 ± 3.8	 P.I.: 67.5 ± 2.5	 P.I.: 0.0

Figura 4. Estimación de los porcentajes de inhibición de rizobacterias con capacidad antagonica.
Figure 4. Estimation of inhibition percentages of rhizobacteria with antagonistic capacity.

Tabla 2. Análisis BLASTN empleando secuencias de la región ADNr 16S de 10 rizobacterias con capacidad antagonista a microorganismos fitopatógenos.**Table 2.** BLASTN analysis using sequences of 16S DNAr from 10 rhizobacteria strains with antagonistic capacity to phytopathogenic microorganisms.

Cepa	Número de acceso GeneBank	Tamaño (pb)	Hit	Porcentaje de identidad	Cobertura	E value
1BTE9	ON088988	971	<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	2e-79
1BT11	ON088991	740	<i>Pseudomonas protegens</i>	100	100	0.0
1BT12	ON088992	740	<i>Pseudomonas protegens</i>	100	100	0.0
2BCR17	ON088989	971	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	100	0.0
2TC11	ON088984	971	<i>Bacillus subtilis</i>	99.69	100	0.0
3TTR11	ON088993	740	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	100	0.0
4TCE16	ON088985	740	<i>Bacillus subtilis</i>	99.79	100	0.0
5TTE1	ON088987	971	<i>Bacillus sp.</i>	100	100	0.0
6TCE22	ON088990	970	<i>Bacillus atrophaeus</i>	100	100	0.0
7TTE11	ON088986	971	<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	0.0

género *Pseudomonas*, específicamente 1BT11, 1BT12 con la especie *P. protegens* y 3TTR11 como sp. (Tabla 2). El género *Bacillus* se caracteriza por incluir una importante variedad de especies bacterianas no patogénicas y con propiedades antagonistas, son fáciles de cultivar y eficientes en el control de plagas y enfermedades (Berg *et al.*, 2005). Se ha documentado que *Bacillus* spp., poseen mecanismos antagonistas que involucran competencia por espacio y nutrientes (Handelsman y Stabb, 1996), antibiosis (Loeffler *et al.*, 1986), así como la promoción del crecimiento y la inducción de resistencia en plantas (Kloepper y Ryu, 2006). Adicionalmente, *Bacillus* spp., forma esporas, permitiéndole sobrevivir y permanecer metabólicamente activo en condiciones hostiles, haciéndolo apropiado para formular productos viables y estables para su uso en el biocontrol. Cawoy *et al.* (2011) demostraron la capacidad inhibitoria de *Bacillus* spp. hacia organismos fitopatógenos como *Verticillium*, *Pythium*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Macrophomina*, *Myrothecium*, *Ramularia*, *Xanthomonas* y *Erysiphe*. La cepa 1BTE9, la cual fue identificada como *B. subtilis*, mostró la capacidad de inhibir a *Cmm*. Utkhede y Koch (2004) reportaron nula incidencia de *Cmm* en cultivos de tomate en invernadero al utilizar tratamientos con productos formulados con *B. subtilis* y *Trichoderma harzianum* aplicados por aspersión en diferentes concentraciones celulares. Asimismo, esta cepa junto con 2TC11, 5TTE1 y 7TTE11 presentaron la capacidad en común de inhibir al hongo *S. maydis*. Petatán-Sagahón *et al.* (2011) lograron aislar e identificar una cepa de *Bacillus subtilis* (160) de suelos rizosféricos agrícolas y las pruebas de enfrentamiento *in vitro* y en campo demostraron que la bacteria y sus extractos celulares inhibieron el desarrollo de *Stenocarpella maydis* y *macrospora*. A las rizobacterias identificadas molecularmente, como *B. amyloliquefaciens* y *B. atrophaeus* (2BCR17, 4TCE16 y 6TCE22), se les atribuyen características de control biológico semejantes a *B. subtilis*. Yoshida *et al.* (2001) aislaron una cepa de *B. amyloliquefaciens* capaz de inhibir hongos y bacterias fitopatógenas en hojas

de plantas de morera (*Morus alba*), utilizadas como alimento en la producción de gusanos de seda.

Finalmente, las rizobacterias identificadas en el género *Pseudomonas* son consideradas importantes agentes de biocontrol debido a su capacidad de inhibir el desarrollo de bacterias, hongos, nemátodos y virus, que infectan y reducen considerablemente el rendimiento de las cosechas en cultivos de invernadero y campo. Los reportes acerca del biocontrol de cepas pertenecientes al complejo *P. fluorescens* indican que los beneficios se deben a la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, como 2,4-diacetilfluoroglucinol (2,4-DAPG), 2-hexilo, 5-propilresorcinol, fenazinas y antibióticos basados en sideróforos como la pirrolnitrina (PRN) y la pioluteorina (PLT) (Garrido-Sanz *et al.*, 2017). Las rizobacterias 1BT11, 1BT12 y 3TTR11 relacionadas con el género *Pseudomonas* y aisladas de *T. terniflora* y *T. coronopifolia* presentaron actividad antifúngica hacia *S. maydis* y *Fusarium* sp., así como actividad antimicrobiana hacia *Cmm*. Algunas investigaciones han demostrado que *P. protegens* (1BT11, 1BT12) es una bacteria capaz de colonizar el interior de las raíces de plantas sin provocar daño, promoviendo relaciones mutualistas con el objetivo de protegerla de hongos fitopatógenos mediante la producción de 2,4-DAPG, PLT, PRN, sideróforos, HCN y proteasas extracelulares (Zhang *et al.*, 2020). La cepa 3TTR11 mostró porcentajes de identidad superiores del 99.5% con *Pseudomonas* sp., *P. extremaustralis*, *P. marginalis* y *P. rhodesiae*, no obstante, solamente la última especie ha sido descrita como una bacteria promotora del crecimiento vegetal, además de solubilizar fósforo, producir sideróforos, ácido indol acético (IAA) y presentar actividad deaminasa ACC y tolerancia a cadmio (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

En conclusión, podemos mencionar que el aislamiento de rizobacterias a partir de la rizosfera de plantas alelopáticas de las especies *T. coronopifolia* y *T. terniflora*,

permitió observar una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de bacterias cultivables aisladas y que la abundancia de bacterias varía mayormente conforme al sitio de aislamiento que con el tiempo de crecimiento de la planta, sin embargo, existe evidencia científica que sugiere una variación de los patrones de exudación de metabolitos secundarios conforme a la etapa fenológica de la planta, lo cual puede modificar la estructura y tamaño de las poblaciones microbianas rizosféricas, y esto, utilizarlo en su beneficio, dependiendo de sus necesidades fisiológicas. Asimismo, la selección e identificación de rizobacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* con actividad antagonista *in vitro* sobre los fitopatógenos *S. maydis*, *Fusarium* sp., y *Cmm* y las cuales posiblemente se encuentran en asociación simbiótica con las plantas en estudio, se les podría atribuir un potencial uso en el control biológico de enfermedades y plagas en plantas de importancia agroeconómica.

REFERENCIAS

- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. y Hallmann, J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 51(2): 215-229.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P. y Ongena, M. 2011. Bacillus-based biological control of plant diseases. In *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*. Stoytcheva, M. (ed.). Rijeka, Croatia: InTech, pp. 274-302.
- Cheng, J., Jin, H., Zhang, J., Xu, Z., Yang, X., Liu, H., Xu, X., Min, D., Lu, D. y Qin, B. 2022. Effects of allelochemicals, soil enzyme activities, and environmental factors on rhizosphere soil microbial community of *Stellera chamaejasme* L. along a growth-coverage gradient. *Microorganisms*. 10(1): 158.
- Cicevan, R., Al Hassan, M., Sestras, A.F., Prohens, J., Vicente, O., Sestras, R.E. y Boscaiu, M. 2016. Screening for drought tolerance in cultivars of the ornamental genus *Tagetes* (Asteraceae). *PeerJ*. 4: e2133.
- David, A.S., Thapa-Magar, K.B. y Afkhami, M.E. 2018. Microbial mitigation–exacerbation continuum: a novel framework for microbiome effects on hosts in the face of stress. *Ecology*. 99: 517-523.
- Doornbos, R.F., van Loon, L.C. y Bakker, P.A.H.M. 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 32: 227-243.
- Fang CX, Yang LK, Chen WS, Li LL, Zhang PL, Li YZ, He HB, Lin WX. MYB57 transcriptionally regulates MAPK11 to interact with PAL2;3 and modulate rice allelopathy. *J Exp Bot*. 2020;71(6):2127–41.
- Gakuubi, M.M., Wagacha, J.M., Dossaji, S.F. y Wanzala, W. 2016. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against selected plant pathogenic bacteria. *International Journal of Microbiology*. 7352509.
- García-Sánchez, F., López-Villafranco, M.E., Aguilar-Rodríguez, S. y Aguilar-Contreras, A. 2012. Etnobotánica y morfoanatomía comparada de tres especies de *Tagetes* que se utilizan en Nicolás Romero, Estado de México. *Botanical Sciences*. 90(3): 221-232.
- Garrido-Sanz, D., Arrebola, E., Martínez-Granero, F., García-Méndez, S., Muriel, C., Blanco-Romero, E., Martín, M., Rivilla, R. y Redondo-Nieto, M. 2017. Classification of isolates from the *Pseudomonas fluorescens* complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Frontiers in Microbiology*. 8: 413.
- Haldar, S., Sengupta, S. 2015. Plant-microbe cross-talk in the rhizosphere: Insight and Biotechnological Potential. *The Open Microbiology Journal*. 9: 1-7.
- Handelsman, J. y Stabb, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*. 8(10): 1855-1869.
- Hernández, T., Leon, D., Rives, N., Diaz, A., Almaguer, M. y Acebo, Y. 2010. Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas fluorescens* con actividad antagonista de *Curvularia* spp. *Protección Vegetal*. 25(3):181-189.
- Hoan, L.T. y Davide, R.G. 1979. Nematicidal properties of root extracts of seventeen plant species on *Meloidogyne incognita*. *Philippine Agriculturist*. 62: 285-295.
- Hooks, C.R.R., Wang, K.H., Ploeg, A., McSorley, R. 2010. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology*. 46(3): 307-320.
- Jeffers, D. 1995. Maize Pathology. In: CIMMYT 1997. *Maize Research in 1995-96*. Maize Program Special Report. México, D. F. pp. 39-41.
- Kloepper, J.W. y Ryu, C.M. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In: Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds) *Microbial Root Endophytes*. Soil Biology, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- Loeffler, W., Tschen, S.M., Vamittanakoon, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T.F. y Wu, T.G. 1986. Antifungal effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology*. 115: 204-213.
- Loockerman, D.J., Turner, B.L. y Jansen, R.K. 2003. Phylogenetic relationships within the *Tageteae* (Asteraceae) based on nuclear ribosomal ITS and chloroplast *ndhF* gene sequences. *Systematic Botany*. 28 (1): 191-207.
- López-López, E., Mejía, O., Mercado-Flores, Y., Téllez-Jurado, A. y Anducho-Reyes, M.A. 2017. Variation of the bacterial communities in the rhizosphere of three species of the genus *Tagetes* (marigold) over time. *Applied Ecology and Environmental Research*. 15(4):1327-1345.
- Majeed, A., Muhammad, Z. y Ahmad, H. 2018. Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. *Plant Cell Reports*. 37(12): 1599-1609.
- Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E. y Romagnoli, C. 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*. 159(3): 295-304.
- Micallef, S.A., Channer, S., Shiaris, M.P. y Colón-Carmona, A. 2009. Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. *Plant Signaling & Behavior*. 4(8): 777-780.
- Miller, M.P. y Ahrens, J.F. 1969. Influence of growing marigolds, weeds, two cover crops and fumigation on sub-sequent

- populations of parasitic nematodes and plant growth. *Plant Disease Reporter*. 53: 642-646.
- Petatán-Sagahón, I., Anducho-Reyes, M.A., Silva-Rojas, H.V., Arana-Cuenca, A., Tellez-Jurado, A., Cárdenas-Álvarez, I.O. y Mercado-Flores, Y. 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(9): 5522-5537.
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P. y Van der Putten, W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 789-799 (2013).
- Qu, T., Du, X., Peng, Y., Guo, W., Zhao, C. y Losapio, G. 2021. Invasive species allelopathy decreases plant growth and soil microbial activity. *PloS one*. 16(2): e0246685.
- Reinoso, Y., Casadesús, L., García, A., Gutiérrez, J. y Álvarez, V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*. 10: 187-191.
- Rodríguez-Mejía, M.L. 2013. Biogeografía y manejo integrado de *Clavibacter michiganenses* subsp. *michiganenses* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol.31 (Suplemento).
- Rolón-Cárdenas, G. A., Arvizu-Gómez, J. L., Pacheco-Aguilar, J. R., Vázquez-Martínez, J. y Hernández-Morales, A. 2021. Cadmium-tolerant endophytic *Pseudomonas rhodesiae* strains isolated from *Typha latifolia* modify the root architecture of *Arabidopsis thaliana* Col-0 in presence and absence of Cd. *Brazilian journal of microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 52(1): 349-361.
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M., Carneiro, J., Leal, A., Coutinho, H., Vitalini, S., Kępiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Silva, N., Yousaf, Z., Martorell, M., Iriti, M., Carradori, S. y Sharifi-Rad, J. 2018. *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules* (Basel, Switzerland). 23(11): 2847.
- Siebers, M., Rohr, T., Ventura, M., Schütz, V., Thies, S., Kovacic, F., Jaeger, K. E., Berg, M., Dörmann, P. y Schulz, M. 2018. Disruption of microbial community composition and identification of plant growth promoting microorganisms after exposure of soil to rapeseed-derived glucosinolates. *PloS one*. 13(7): e0200160.
- Siddiqui, M.A. y Alam, M.M. 1987. Utilization of marigold plant wastes for the control of plant parasitic nematodes. *Biological Wastes*. 21:221-229.
- Sturz, A. y Kimpinski, J. 2004. Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant and Soil*. 262: 241-249.
- Topp, E., Millar, S., Bork, H. y Welsh, M. 1998. Effects of marigold (*Tagetes* sp.) roots on soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 27: 149-154.
- Utkhede, R. y Koch, C. 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*. 49: 305-313.
- von der Schulenburg, J.H.G., Hancock, J.M., Pagnamenta, A., Sloggett, J.J., Majerus, M.E.N. y Hurst, G.D.D. 2001. Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Molecular Biology and Evolution*. 18:648-660.
- Xiao, Z.X., Lu, S.G. y Xu, Z.H. 2019. Biochemistry of allelopathic plant residues in soil. *Ekoloji*. 28(107):2997-3006. Article No: e107336.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. y Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*. 91(2): 181-187.
- Zhang, Q.X., Kong, X.W., Li, S.Y., Chen, X.J. y Chen, X.J. 2020. Antibiotics of *Pseudomonas protegens* FD6 are essential for biocontrol activity. *Australas. Plant Pathology*. 49: 307-317.
- Zuo, S., Li, X., Ma, Y., Yang, S. 2014. Soil microbes are linked to the allelopathic potential of different wheat genotypes. *Plant Soil*. 378: 49-58.



Recubrimientos a base de alginato de sodio extraído de *Sargassum fluitans* y nanopartículas de plata para prolongar la vida en anaquel de papaya (*Carica papaya* L.)

Coatings based on sodium alginate extracted from *Sargassum fluitans* and silver nanoparticles to prolong the shelf life of papaya (*Carica papaya* L.)

Martínez-Molina EC*¹, Abud-Archila M¹, Freile-Pelegrín Y², Luján-Hidalgo MC¹, Gutiérrez-Miceli FA¹, Ovando-Chacón SL¹

¹ Tecnológico Nacional de México/IT de Tuxtla Gutiérrez, Carr. Panamericana km 1080, C.P. 29050, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

² Departamento de Recursos Marinos, CINVESTAV, Mérida, Yucatán, México

RESUMEN

La papaya es un fruto climatérico que tiene una vida en anaquel corta. Una opción para prolongar la vida útil de este fruto es el uso de recubrimientos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del recubrimiento a base de alginato extraído de *Sargassum fluitans* adicionado con nanopartículas de plata (NpAg) sobre la vida en anaquel de papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol). Las NpAg se obtuvieron mediante síntesis verde. Las papayas, en grado de madurez 3, fueron recubiertas con tres soluciones: solución 1 (2.49 % alginato), solución 2 (2.49 % alginato y 1.1 mg NpAg/mL) y el grupo control (agua). Los frutos se pincelaron y se almacenaron 15 días a 25 °C y 75 % de humedad relativa. Los frutos recubiertos con las soluciones 1 y 2 mantuvieron valores óptimos de firmeza (6.9 y 6.6 MPa), sólidos solubles totales (11.1 y 11.06 °Brix) y contenido de ácido ascórbico (22.31 y 23.02 mg AA/g pulpa) durante 6 días más que el control. Los recubrimientos de alginato de sodio extraído de *S. fluitans* adicionado o no con NpAg retardaron la maduración de la papaya. Esta tecnología permite prolongar la vida en anaquel de la papaya a 25 °C sin utilizar refrigeración.

Palabras clave: Recubrimiento, alginato de sodio, *Sargassum fluitans*, nanopartículas de plata, papaya.

ABSTRACT

Papaya is a climacteric fruit that has a short shelf life. An alternative to extend the shelf life of this fruit is the use of coatings. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the coating based on alginate extracted from *Sargassum fluitans* added with silver nanoparticles, on the shelf life of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol). Silver nanoparticles (NpAg) were obtained by green synthesis. Papaya fruits in degree of maturity 3, were coated with three solutions: solution A (2.49 % alginate), solution B (2.49 % alginate and 1.1 mg NpAg/mL) and group control (water). The coated fruits were stored for 15 days at 25 °C and 75 % of relative humidity. The fruits coated with solution 1 and 2 maintained optimal values of firmness (6.9 and 6.6 MPa), total soluble solids (11.1 and 11.06 °Brix) and ascorbic acid

content (22.31 and 23.02 mg AA/g pulp) for 6 more days than control. The coating of sodium alginate extracted from *S. fluitans* added or not with NpAg retarded the maturation of the papaya. This technology allowed to prolong the shelf life of papaya at 25 °C without refrigeration.

Keywords: Coating, sodium alginate, *Sargassum fluitans*, silver nanoparticles.

INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol) es un fruto de elevado valor nutricional (Vieira *et al.*, 2020) y representa una fuente de ácido ascórbico (vitamina C), con valores que oscilan entre 35.4 y 87 mg/100 g de pulpa. Así también, la papaya tiene un alto contenido de carotenoides como el β-caroteno precursor de retinol (vitamina A) (Bautista-Baños *et al.*, 2013). En México, este fruto es de gran importancia económica al ser el tercer mayor productor de papaya en el mundo con 1,039,820 ton/año y el principal exportador de papaya en el mundo (Castillo-Herrera *et al.*, 2020). Sin embargo, la papaya es un fruto climatérico por lo que es altamente perecedero con una corta vida en anaquel (Vela-Gutiérrez *et al.*, 2019). Aunado a esto, la papaya es altamente susceptible al ataque fúngico, principalmente por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* ocasionando pérdidas postcosecha (Maringal *et al.*, 2019). El uso de tratamiento térmico combinado con fungicidas como tratamiento postcosecha, seguidos de refrigeración durante el almacenamiento y transporte, ayuda a retrasar la maduración y crecimiento de fitopatógenos (Rodrigues *et al.*, 2021). Sin embargo, estos tratamientos no son suficientes para mitigar el problema, especialmente cuando las papayas se mantienen a temperatura ambiente. Por lo anterior, los investigadores buscan tecnologías para prolongar la vida en anaquel de frutos frescos que permita el transporte de los frutos sin refrigeración, explorando nuevos ingredientes. Bajo esa óptica, el desarrollo de películas o recubrimientos es una forma innovadora y efectiva para prolongar la vida útil de frutos frescos además de que esta tecnología permite la incorporación de aditivos antifúngicos. Vieira *et al.* (2020) estudiaron el efecto del recubrimiento a

*Autor para correspondencia: Esther Candelaria Martínez-Molina
 Correo electrónico: martinez.molina.e15@gmail.com

Recibido: 21 de abril del 2022

Aceptado: 05 de agosto de 2022

base de hidroxipropilmetilcelulosa con nanopartículas de plata aplicado a papaya almacenada a 10 °C. Sin embargo, estos autores no reportaron cuanto tiempo se prolonga la vida útil del fruto aunado a que el experimento se llevó a cabo en refrigeración.

Dentro de los polímeros comúnmente utilizados como recubrimientos destacan los alginatos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y buena capacidad de formación de película (Barrera *et al.*, 2021). El alginato es principalmente obtenido de algas pardas, siendo las del género *Sargassum* quienes se han usado como fuente de principal. Las ventajas con respecto a otras fuentes son su abundancia en la naturaleza, el proceso de extracción es fácil y los costos de fabricación son bajos (Borazjani *et al.*, 2017). Particularmente, *Sargassum fluitans* contiene más de 40 % de alginato según lo reportado por Davis *et al.* (2003). Esta alga ha arribado a la costa del Caribe Mexicano en cantidades masivas desde el 2014 y su acumulación y descomposición en las playas afecta los ecosistemas costeros y la industria turística (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2016). No obstante, el alginato extraído de *S. fluitans* mezclado con nanopartículas de plata (NpAg) obtenidas por síntesis verde formó películas con atractivas propiedades mecánicas, con baja permeabilidad al vapor de agua y actividad antifúngica contra el hongo *C. gloesporioides*, así como para un amplio rango de microorganismos (Martínez-Molina *et al.*, 2022). Raut-Rajesh *et al.* (2009) mencionan que las nanopartículas obtenidas por síntesis verde, usando extractos acuosos de *Gliricidia sepium* presentan ventajas contra la síntesis química, al ser tecnologías más económicas y amigables con el ambiente. A pesar de ello, el alginato extraído de *S. fluitans* adicionado o no con NpAg obtenidas mediante síntesis verde aún no ha sido utilizado para el desarrollo de recubrimientos aplicados a frutas.

Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del recubrimiento a base de alginato extraído de *S. fluitans* adicionado con nanopartículas de plata (NpAg) sobre la vida en anaquel de papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Sargassum fluitans (Børgesen) Børgesen fue recolectada en marzo de 2019 en la costa de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. El alga fue secada al sol durante dos días, se trituró a un tamaño de partícula < 3 mm y se almacenó en bolsas herméticas hasta su uso. Las hojas de *G. sepium* fueron colectadas en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (México) en mayo 2021. Las hojas fueron secadas en sombra, trituradas (< 0.8 mm) y preservadas en oscuridad en congelación hasta su uso. Los reactivos usados fueron de la marca Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EU).

Extracción de alginato de *Sargassum fluitans* y síntesis de NpAg

El extracto de *G. sepium* fue obtenido utilizando 5 g de hoja seca en polvo los cuales se mezclaron con 100 mL

de agua destilada. La mezcla se calentó a ebullición durante 5 min en agitación constante (100 rpm) según lo reportado por Rolim *et al.* (2019). El extracto se dejó enfriar, se filtró con papel filtro Whatman No. 2 y finalmente se almacenó en frasco ámbar en refrigeración hasta su uso para la síntesis de las nanopartículas.

El alginato fue extraído de *Sargassum fluitans* de acuerdo al método propuesto por Martínez-Molina *et al.* (2022). El alga fue digerida en Na₂CO₃ al 3 % y filtrada al vacío. Este filtrado fue decolorado agregando H₂O₂ 3 % (1:1 p/v, g inicial de alga: mL H₂O₂) y mantenido en agitación a 100 rpm por 20 min. Posteriormente, el filtrado decolorado fue resuspendido en etanol (1:2 v/v) para la recuperación de las fibras de alginato insolubles en etanol, las cuales se dejaron secar en estufa (60 °C, 24 h). Las NpAg se prepararon mezclando el extracto acuoso de *G. sepium* (1:20 p/v) y solución metálica de AgNO₃ (10 mM) en relación 1:4 (extracto acuoso de *G. sepium* (v): solución metálica de AgNO₃ (v)). La mezcla se mantuvo en agitación a 100 rpm por 2 h a 60 °C en oscuridad. El cambio de color de amarillo claro a café oscuro de la solución fue un indicador de la síntesis de NpAg (Martínez-Molina *et al.*, 2022).

Formulación de recubrimientos

Los recubrimientos fueron formulados con alginato de *Sargassum fluitans* y nanopartículas de plata de la siguiente manera: solución 1 conteniendo alginato al 2.49 % y la solución 2 conteniendo alginato al 2.49 % y 1.11 mg NpAg/mL, en ambas soluciones se agregó glicerol como plastificante (0.33 g/g alginato). Estas concentraciones fueron elegidas de acuerdo a estudios previos (Martínez-Molina *et al.*, 2022). Estas soluciones fueron mezcladas con un homogenizador Ultra-Turrax (Ika Ultra-Turrax® T25 Basic, Carolina del Norte, EU) a 13,000 rpm por 5 min según lo reportado por Robles-Flores *et al.* (2018). Para el grupo control se utilizó agua pura. La viscosidad cinemática y densidad de las soluciones 1 (alginato al 2.49 %) y 2 (2.49 % y 1.11 mg NpAg/mL) fueron determinadas con un viscosímetro (Cannon-Fenske) y densímetro a 40 °C.

Aplicación de recubrimiento a papaya fresca

Las papayas (*Carica papaya* L. var. Maradol), sin ningún tratamiento, fueron cosechadas en el rancho San Juan, ubicado en el municipio de Acala, Chiapas, México (16°30'22" latitud norte, 92°45'42" latitud oeste), propiedad de la empresa AGROMOD S.A. de C.V. Las papayas seleccionadas fueron las que tuvieron un peso entre 1 y 1.5 kg, un grado de madurez 3 con dos rayas amarillas en el epicarpio, de acuerdo a la escala de Santamaría-Basulto (2009), sin daño mecánico visible, ni manchas en su superficie y sin infecciones fúngicas visibles. Las papayas fueron lavadas con agua purificada y clasificadas al azar en tres grupos (A, B y C) con 21 frutas cada uno. Una capa del recubrimiento fue aplicada a cada papaya mediante la técnica de pincelado. El grupo A fue recubierto con la solución 1 (7.5 mL de solución), el grupo B fue recubierto con la solución 2 (7.5 mL de solución) y el

grupo C fue recubierto con 7.5 mL de agua potable (grupo control). Después de aplicar el recubrimiento, las papayas se dejaron secar durante 1 h a 25 °C y HR de 75 %. Las papayas una vez secas se envolvieron hasta la mitad con papel estraza y se colocaron en cajas de cartón con el pedúnculo hacia abajo durante 15 días a 25 ± 1 °C y humedad relativa de 70-75 %. En cada monitoreo, tres papayas fueron retiradas de cada grupo y los índices de maduración de la papaya se midieron a los 0, 2, 4, 6, 9, 12 y 15 días. Es importante mencionar que la aplicación de más de una capa de recubrimiento fue también evaluada preliminarmente, sin embargo, los frutos en donde el alginato con las nanopartículas fue aplicado presentaron una coloración oscura perdiendo complemente el color característico de la papaya (datos no mostrados), por lo que se aplicó una sola capa del recubrimiento. Además, en ese estudio preliminar, un volumen de 7.5 mL de solución formadora de recubrimiento fue adecuada para cubrir a cada papaya (datos no mostrados).

Índices de maduración de la papaya Pérdida de peso y cambios en el color

La pérdida de peso de las papayas fue calculada como el porcentaje de pérdida de peso del fruto en relación con su peso inicial (Barrera *et al.*, 2015). Los cambios de color de la papaya se determinaron en epicarpio analizando tres puntos de referencia en el eje ecuatorial, y en mesocarpio, para lo cual se hizo un corte longitudinal al fruto y se midió el color en tres puntos (centro y extremos). Las mediciones se hicieron con un colorímetro portátil (Konica minolta modelo CM-2500d, Japón). Los resultados del color se reportaron como el cambio de color (ΔDC^*) calculado con la ecuación 1, usando los valores L^* , a^* y b^* de la escala CIELab (Zhang *et al.*, 2019).

$$\Delta DC^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Con:

$$\Delta L^* = L_t^* - L_{in}^*$$

$$\Delta a^* = a_t^* - a_{in}^*$$

$$\Delta b^* = b_t^* - b_{in}^*$$

Donde ΔL^* representa el diferencial de luminosidad, L_t^* representa el valor de luminosidad cada día de muestreo, L_{in}^* el valor de luminosidad al inicio del experimento; Δa^* es el diferencial del valor de a^* (que va desde $-a^*$ en color verde hasta $+a^*$ en color rojo), a_t^* es el valor de a^* cada día de muestreo, a_{in}^* representa el valor de a^* al inicio del experimento; y Δb^* es el diferencial del valor de b^* (que va desde $-b^*$ en color azul hasta $+b^*$ en color amarillo), b_t^* representa el valor de b^* cada día de muestreo y b_{in}^* representa el valor de b^* al inicio del experimento.

Determinación de carotenoides en mesocarpio

Los carotenoides totales se determinaron usando la metodología de Carvalho *et al.* (2012) con ligeras modificaciones. La pulpa (15 g) se trituró con 3 g de célite 454 adicionando 25 mL de acetona hasta obtener una pasta. La muestra se filtró al vacío y la extracción se llevó a cabo tres veces. El extracto fue transferido a un embudo de separación con 40 mL de hexano y se mantuvo en reposo durante 10 min para lograr la separación de las fases. El extracto hexánico se transfirió a un matraz con 15 g de sulfato de sodio anhidro, y finalmente, se determinó la absorbancia en espectrofotómetro (Beckman coulter modelo DU 730, EU) a 450 nm. El contenido de carotenos fue calculado con la ecuación 2.

$$\text{contenido de carotenoides} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{A_{450} * V(\text{mL}) * 10^4}{2592 * P(\text{g})} \quad (\text{Eq. 2})$$

Donde es Absorbancia media a 450 nm; 10^4 es la constante de conversión de unidades $\mu\text{g/g}$; V es el volumen final (mL); 2592 es el coeficiente de extinción molar de β -caroteno en hexano y P(g) es el peso de la muestra en gramos.

Determinación de la firmeza del mesocarpio

La firmeza del mesocarpio de la papaya se determinó en cinco puntos equidistantes en un eje ecuatorial. Para esta prueba se retiró manualmente parte del epicarpio (2 mm de profundidad) y se midió la firmeza en mesocarpio con un penetrómetro (Wagner FT 02, EU) con dos puntas de prueba: 2 y 8 mm de diámetro de cilindro con 3 cm de longitud (Hamzah *et al.*, 2013). Los resultados fueron expresados como el promedio de las cinco medidas de cada uno de los tres frutos.

Sólidos solubles totales, acidez titulable y pH del mesocarpio de la papaya

El contenido de sólidos solubles totales (SST) se determinó con el método del AOAC 932 (AOAC, 2000), el pH con un potenciómetro y la acidez titulable (AT) con el método AOAC 942.15 (AOAC, 2000).

Determinación de ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico fue determinado por el método de Zhang *et al.* (2019) con algunas modificaciones. La pulpa (10 g) se trituró en 40 mL de ácido oxálico (2 %; p/v) y se filtró al vacío. El filtrado se aforó a 100 mL con ácido oxálico (2 %) y 10 mL de esta solución fue valorada con 2,6-dicloro-fenol-indol (0.01 %; p/v). Los datos se expresaron como mg de ácido ascórbico por cada 100 g de pulpa.

Determinación de concentración de plata en la pulpa de papaya

La concentración de plata migrada al mesocarpio de la papaya fue determinada en los grupos A y B a los 15 días de almacenamiento usando espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES, Perkin Elmer, Nexlon 300 D, Shelton, EU). Para lo cual, 150 mg de pulpa fueron digeridos con 5 mL de HNO_3 concentrado y 2 mL de H_2O_2 en microondas (240 °C, 800 psi, 10 min). La

muestra digerida fue aforada a 25 mL usando HNO_3 1 %. Los resultados se expresaron como concentración de plata metálica (mg Ag/kg de pulpa).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los resultados se analizaron mediante un ANOVA ($p \leq 0.05$) utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. La prueba de Tukey se utilizó para evaluar la diferencia entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La viscosidad cinemática y densidad de las soluciones 1 (alginato al 2.49 %) y 2 (2.49 % y 1.11 mg NpAg/mL) a 40 °C fueron de 38.5 ± 1.2 y 37.3 ± 1.0 cSt, respectivamente; mientras que la densidad fue de 0.98 ± 0.002 g/mL para ambas soluciones. Estos valores muestran que el alginato promovió el incremento de la viscosidad de la solución con respecto al agua, sin embargo, la adición de nanopartículas no repercutió en dicho valor. Lo anterior es deseado para los fines de tener un recubrimiento que sea fácil de aplicar, que no escurra al momento de ser aplicado y que se adhiera al fruto.

Índices de maduración de papaya

Pérdida de peso

La pérdida de peso es considerada como una de las características principales que determinan la vida útil del fruto, debido a que tienden a perder peso continuamente

durante la postcosecha. Los resultados de la pérdida de peso de las papayas durante los 15 días de almacenamiento son presentados en la Tabla 1. En esta tabla se observa que la pérdida de peso de las papayas incrementa con el tiempo de almacenamiento, obteniendo un promedio de 13.68, 11.76 y 11.79 % de pérdida de peso en las papayas control, con recubrimiento de alginato (2.49 % alginato) y con recubrimiento de alginato y nanopartículas (2.49 % alginato y 1.11 mg NpAg/mL) respectivamente en los 15 días de almacenamiento, sin mostrar diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos en cada tiempo de monitoreo. La pérdida de peso de la fruta se debe principalmente al proceso de transpiración que está determinado por el gradiente de presión de vapor de agua entre la fruta y el aire circundante (Monzón-Ortega *et al.*, 2018). Los resultados mostraron que el recubrimiento a base de alginato con o sin nanopartículas no constituyó una barrera a la pérdida de peso de la papaya durante el almacenamiento. Este comportamiento puede ser explicado debido a la naturaleza hidrofílica del alginato y a la elevada permeabilidad al vapor de agua de películas preformadas a base de alginato y NpAg según lo reportado por Martínez-Molina *et al.* (2022).

Color y contenido de carotenoides

El color es el principal determinante visual de la maduración de la papaya. En la Figura 1 se muestra el efecto de los recubrimientos sobre la variación de color (ΔDC^*) del epicarpio. Las papayas del tratamiento control presentan mayor diferencial de color a partir del día 2 de monitoreo, en

Tabla 1. Efecto de los recubrimientos A (2.49 % alginato), B (2.49 % y 1.11 mg NpAg/mL) y grupo control (agua) sobre la pérdida de peso, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable, pH, ácido ascórbico de papayas almacenadas a 25 °C durante 15 días.

Table 1. Effect of A (2.49 % alginate), B (2.49 % and 1.11 mg NpAg/mL), and control (water) coatings and control group on weight loss, total soluble solids (SST), titratable acidity, pH and ascorbic acid content of papaya stored at 25 °C for 15 days.

Parámetro	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)						
		0	2	4	6	9	12	15
Pérdida de peso (%)	Control	0 ^a	1.63 ^a	3.0 ^a	4.69 ^a	7.37 ^a	10.17 ^a	13.68 ^a
	A	0 ^a	2.09 ^a	3.38 ^a	5.25 ^a	7.07 ^a	8.72 ^a	11.76 ^a
	B	0 ^a	1.58 ^a	2.97 ^a	4.46 ^a	6.98 ^a	9.44 ^a	11.79 ^a
SST (°Brix)	Control	7.6 ^a	8.26 ^a	8.4 ^a	8.8 ^a	10.8 ^a	11.6 ^a	13.8 ^a
	A	7.6 ^a	7.6 ^a	8.73 ^a	8.91 ^a	9.13 ^b	10.33 ^{ab}	11.1 ^b
	B	7.6 ^a	8.43 ^a	8.46 ^a	8.5 ^a	8.33 ^c	9.06 ^c	11.06 ^b
Acidez titulable (%)	Control	0.158 ^a	0.133 ^a	0.112 ^a	0.104 ^a	0.105 ^a	0.080 ^a	0.063 ^b
	A	0.158 ^a	0.131 ^a	0.104 ^a	0.102 ^a	0.088 ^b	0.082 ^a	0.087 ^a
	B	0.158 ^a	0.128 ^a	0.121 ^a	0.095 ^a	0.090 ^b	0.085 ^a	0.093 ^a
pH	Control	5.5 ^a	5.7 ^a	5.6 ^a	6.7 ^a	6.5 ^a	6.4 ^a	6.5 ^a
	A	5.8 ^a	5.6 ^a	5.7 ^a	6.5 ^a	6.2 ^a	6.3 ^a	6.3 ^a
	B	5.7 ^a	5.7 ^a	5.6 ^a	6.5 ^a	6.5 ^a	6.36 ^a	6.56 ^a
Ácido Ascórbico (mg AA/g pulpa)	Control	36.97 ^a	32.41 ^a	29.57 ^a	26.57 ^a	23.87 ^b	20.17 ^b	15.47 ^b
	A	36.97 ^a	35.83 ^a	29.85 ^a	27.72 ^a	26.86 ^a	24.58 ^a	22.31 ^a
	B	36.97 ^a	33.69 ^a	28.85 ^a	27.86 ^a	24.16 ^b	23.45 ^a	23.02 ^a

*Letras diferentes en la misma columna para cada parámetro significa diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos en cada día de monitoreo según la prueba de Tukey.

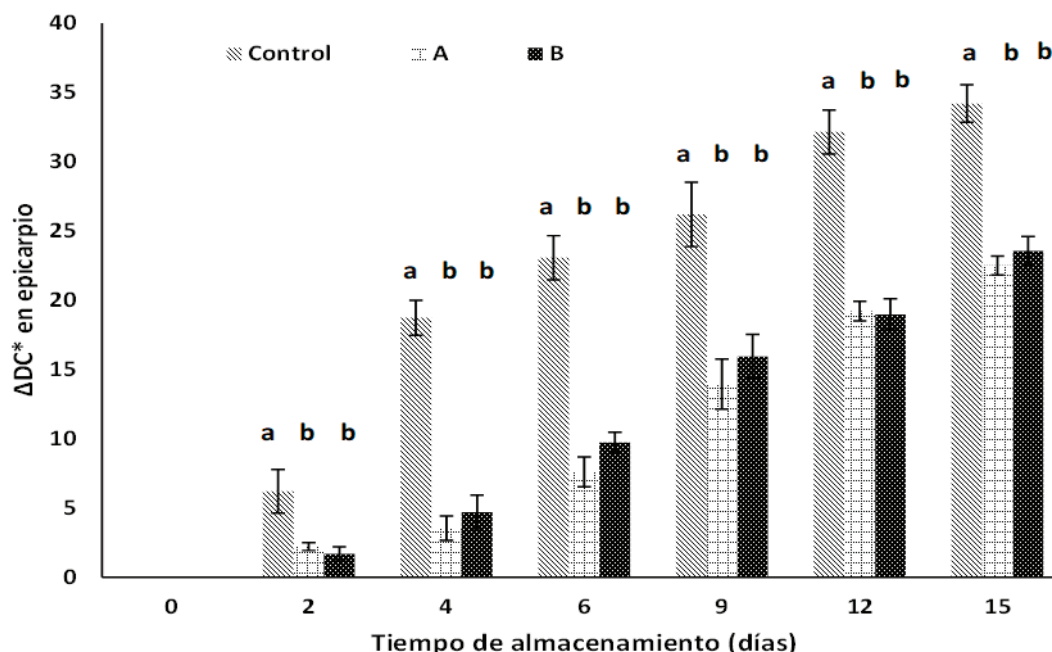


Figura 1. Efecto de los recubrimientos de A (2.49 % alginato), B (2.49 % y 1.11 mg NpAg/mL) y grupo control sobre ΔDC en epicarpio de papayas almacenadas a 25 °C durante 15 días. *Barras verticales muestran la desviación estándar de los promedios. Letras diferentes en cada tiempo indicaron que hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos según la prueba de Tukey.

Figure 1. Effect of A (2.49 % alginate), B (2.49 % and 1.11 mg NpAg/mL), and control group coatings on ΔDC in papaya epicarp stored at 25 °C for 15 days. *Vertical bars show the standard deviation of the means. Different letters each time indicated a statistically significant difference ($p < 0.05$) between treatments according to Tukey's test.

comparación con las papayas con recubrimiento ($p < 0.05$). Así también, se observa un mayor incremento del ΔDC* de las papayas control a partir del día 4, a diferencia de las papayas de los tratamientos A y B, los cuales presentan incrementos menores. Lo anterior indica que el recubrimiento provoca cambios de color menores del fruto durante el almacenamiento, lo que podría relacionarse con una maduración prolongada. Resultados similares fueron reportados por Zhang *et al.* (2019) en papayas recubiertas con quitosano. Por su parte, Shen *et al.* (2019) reportaron, en las primeras etapas de maduración, que el epicarpio presenta un alto contenido de clorofila, lo que le otorga la coloración verde al fruto. Sin embargo, el contenido de clorofila disminuye drásticamente durante la maduración degradándose por acción de la clorofilasa, sintetizándose gradualmente licopeno y β-caroteno dando lugar la formación del color amarillo-anaranjado. A su vez, el mesocarpio en papaya ha sido reportado por su alto contenido de carotenoides en su madurez comercial, a esto se debe la conocida coloración naranja en estos frutos.

En la Figura 2 se presentan los resultados de diferencial de color (ΔDC*) del mesocarpio de las papayas durante el almacenamiento. Las papayas sometidas a los tratamientos A y B presentan menor diferencial de color en comparación con los frutos control a partir del día 2 ($p < 0.05$). De acuerdo a Barreto *et al.* (2011), si la concentración de etileno disminuye en la atmósfera circundante del fruto, podría afectar la actividad de las enzimas fitoeno sintasa (PSY) y fitoeno desaturasa (PDS), dando como resultado una disminución en la síntesis de carotenoides, como ocurrió en los frutos recubiertos. Lo

anterior puede observarse en la Figura 3, en donde el contenido de carotenoides totales en los frutos aumentó durante la maduración, pero en los frutos recubiertos, el contenido de carotenoides fue estadísticamente inferior a los frutos control. Fabi y do Prado (2019) reportaron que la disminución de carotenoides, tanto en epicarpio como en mesocarpio, puede ocurrir por la inhibición de la PSY y de la PDS, enzimas involucradas en la síntesis de carotenoides y activadas por el etileno. Lo anterior es un indicativo de la disminución de la velocidad de maduración de los frutos recubiertos.

Firmeza en mesocarpio

La firmeza del fruto es otro de los principales indicadores de calidad que influye en la elección del fruto. Uno de los principales cambios drásticos en la maduración del fruto es el ablandamiento acelerado de la pulpa durante el almacenamiento. Las papayas inicialmente presentaron una firmeza promedio de 16 MPa (Figura 4), la cual se mantuvo constante durante los primeros 6 días de almacenamiento independientemente del tratamiento. Sin embargo, al día 9 la firmeza de las papayas control disminuyó hasta alcanzar un valor de 5.6 MPa, valores estadísticamente inferiores ($p < 0.05$) a la de los frutos con recubrimientos los cuales presentaron una firmeza de 8.5 MPa y 9.4 MPa para el tratamiento A y B, respectivamente. Zhang *et al.* (2019) obtuvieron resultados de firmeza superiores a los nuestros al día 14 de monitoreo (12 - 15 MPa) en recubrimientos a base de quitosano y pululano aplicados a papaya, sin embargo, las papayas no alcanzaron los valores de firmeza en madurez de consumo

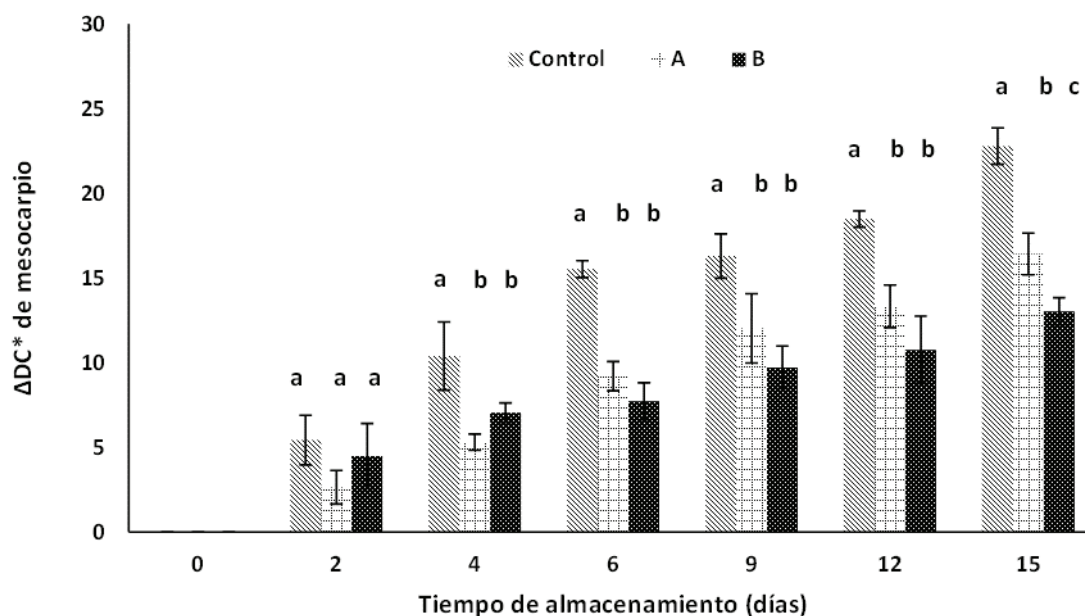


Figura 2. Efecto de los recubrimientos de A (2.49 % alginato), B (2.49% y 1.11 mg NpAg/mL) y grupo control sobre el Δ DC del mesocarpio de papayas almacenadas a 25 °C durante 15 días. *Barras verticales muestran la desviación estándar de los promedios. Letras diferentes en cada tiempo indicaron que hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos según la prueba de Tukey.

Figure 2. Effect of A (2.49 % alginate), B (2.49 % and 1.11 mg NpAg/mL) and control group coatings on the Δ DC of papaya mesocarp stored at 25 °C for 15 days. *Vertical bars show the standard deviation of the means. Different letters in each time indicated a statistically significant difference ($p < 0.05$) between treatments according to Tukey's test.

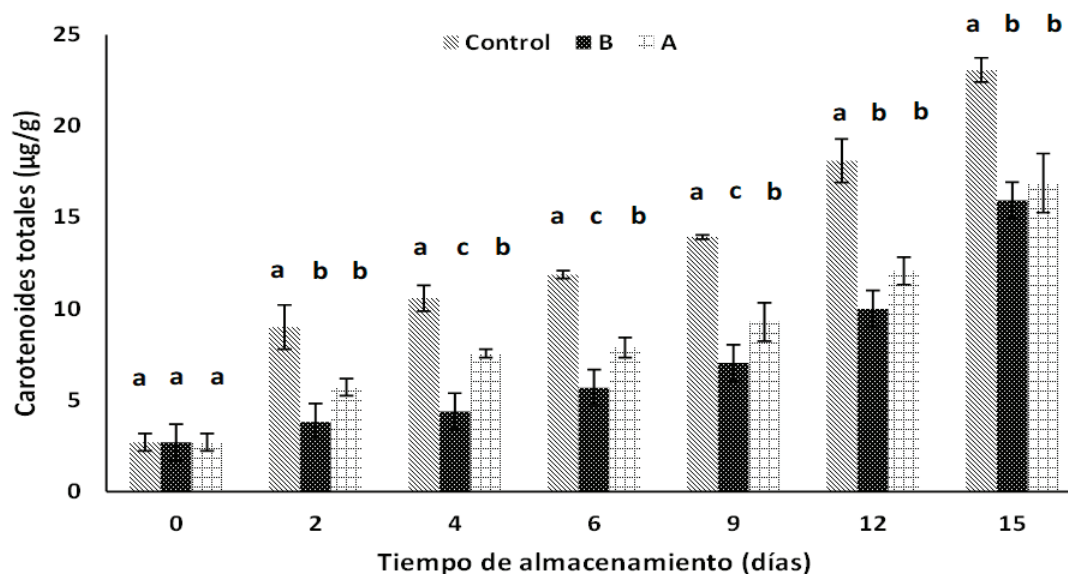


Figura 3. Efecto de los recubrimientos A (2.49 % alginato), B (2.49 % y 1.11 mg NpAg/mL) y grupo control sobre el contenido de carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$) de papayas almacenadas a 25 °C durante 15 días. *Barras verticales muestran la desviación estándar de los promedios. Letras diferentes en cada tiempo indicaron que hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos según la prueba de Tukey.

Figure 3. Effect of A (2.49 % alginate), B (2.49 % and 1.11 mg NpAg/mL) and control group coatings on the content of total carotenoids ($\mu\text{g/g}$) of papayas stored at 25 °C for 15 days. *Vertical bars show the standard deviation of the means. Different letters in each time indicated statistically significant difference ($p < 0.05$) between treatments according to Tukey's test.

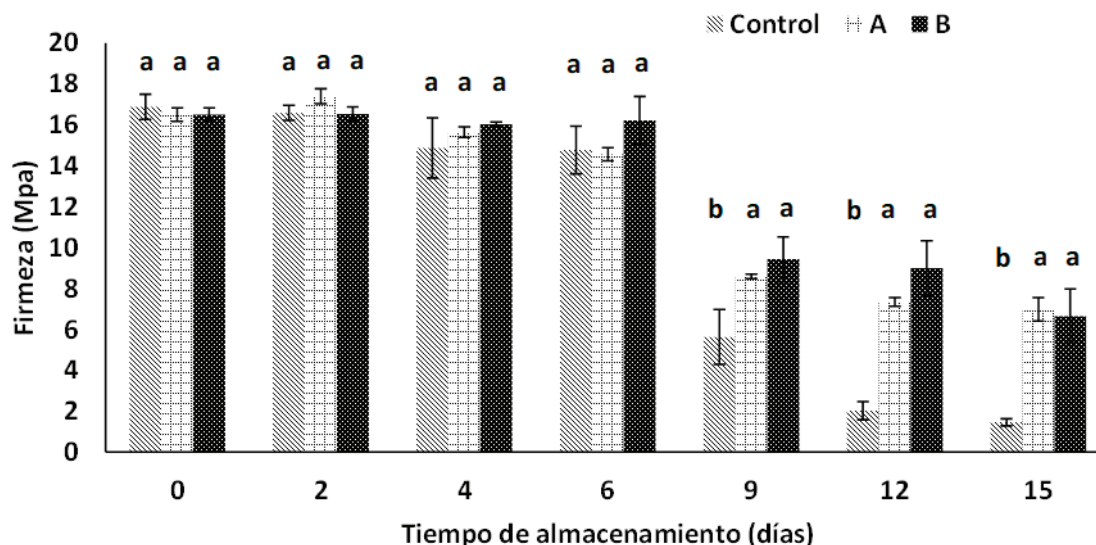


Figura 4. Efecto de los recubrimientos A (2.49 % alginato), B (2.49 % y 1.11 mg NpAg/mL) y grupo control sobre la firmeza de papayas almacenadas a 25 °C durante 15 días. *Barras verticales muestran la desviación estándar de los promedios. Letras diferentes en cada tiempo indicaron que hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos según la prueba de Tukey.

Figure 4. Effect of A (2.49 % alginate), B (2.49 % and 1.11 mg NpAg/mL) and control group coatings on the firmness of papayas stored at 25 °C for 15 days. *Vertical bars show the standard deviation of the means. Different letters in each time indicated statistically significant difference ($p < 0.05$) between treatments according to Tukey's test.

propuesta por Santamaría-Basulto *et al.* (2009). Estos mismos autores reportaron que las papayas en estado de madurez comercial tienen una firmeza que oscila entre 7 - 4 MPa, sin embargo, aquellas papayas que presentan una firmeza inferior a 4 MPa ya se encuentran en un estado de senescencia. Lo anterior sugiere que las papayas control en el presente estudio entraron en estado de senescencia después del día 9 de almacenamiento, mientras que las papayas recubiertas (tratamiento A y B) se encontraron en su madurez de consumo hasta el día 15 de almacenamiento. El recubrimiento entonces disminuyó probablemente la producción de etileno en las papayas, influyendo así en la firmeza del fruto. El ablandamiento de la pulpa del fruto es causado principalmente por la degradación de la pared vegetal, la cual está compuesta por una matriz de microfibrillas de celulosa unidas entre sí, por hemicelulosas y pectina (Carpita y Giberaut, 1993). Esta degradación se da por acción de las pectinasas: poligalacturonasas, pectato liasas, pectina metil esterasa, así como de hemicelulasa y celulosa (Fabi y do Prado, 2019). La actividad de estas enzimas está asociada a un incremento de etileno durante la maduración (Fabi y do Prado, 2019), lo que sugiere la disminución del etileno en las papayas recubiertas.

Sólidos solubles totales en mesocarpio

La composición primaria de azúcares solubles es crucial e impacta fuertemente en el dulzor de la papaya. En la Tabla 1 se presentan los resultados de SST reportados en °Brix en donde se observa que el contenido de SST de las papayas incrementó con el tiempo de almacenamiento. Lo anterior es debido a que los polisacáridos de la papaya en estado de madurez inicial son hidrolizados a azúcares más simples incrementando los SST durante la maduración. Sin embargo,

el contenido de SST en las papayas recubiertas (A y B) fue estadísticamente menor que en las papayas de los tratamientos control ($p < 0.05$) a partir del día 9 de almacenamiento. Esto indica que el recubrimiento probablemente disminuyó la actividad de enzimas involucradas en la hidrólisis de polisacáridos en el fruto. Zhou y Paull (2001) reportaron que en el metabolismo de los azúcares solubles en papaya influyen diversos factores, principalmente intervienen tres enzimas: la sacarosa fosfato sintasa, la sacarosa sintasa y la ácido invertasa. Estas enzimas además están asociadas a un aumento en la síntesis de etileno durante la maduración (Gómez *et al.*, 1999). A su vez, Yang (1986) mencionó que en la etapa final de la ruta biosintética del etileno interviene la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC oxidasa), la cual utiliza oxígeno para completar la reacción, resultando en etileno (C_2H_4), cianuro de hidrógeno (HCN) y bióxido de carbono (CO_2) como productos de la reacción. Por lo que es probable que el recubrimiento a base de alginato, debido a su estructura altamente polar (dada por los grupos carboxilos e hidroxilos), formaron una barrera semipermeable al oxígeno, interfiriendo en este paso final de la síntesis de etileno, disminuyendo así la expresión de enzimas dependientes de la acumulación de etileno en el fruto.

Acidez y pH en mesocarpio

El contenido de ácidos orgánicos en los frutos tiende a disminuir durante el proceso de maduración debido a la oxidación del ácido cítrico en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, es por ello, que la disminución de la acidez en los frutos suele ser un indicador de madurez (Zhang *et al.*, 2019). Sin embargo, los frutos de papaya no se caracterizan por mostrar altos contenidos de acidez en el fruto (Monzón-Ortega *et al.*,

2018), llegando a obtener una acidez titulable inferior al 0.16 %. Como se puede observar en la tabla 1, en todos los tratamientos la acidez de las papayas osciló entre 0.063 y 0.158 % durante el almacenamiento.

El pH de la papaya incrementó con el tiempo de almacenamiento (Tabla 1), lo cual está relacionado con la acidez titulable. Zhang *et al.* (2019) reportaron que el pH de la papaya en madurez comercial debe ser cercano al neutro, tal como los resultados obtenidos en el presente estudio, cuyos valores oscilaron entre 6.3 y 6.7 a partir del día 6 de almacenamiento (Tabla 1), sin mostrar diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0.05$).

Contenido de ácido ascórbico en mesocarpio

El contenido de ácido ascórbico (AA) de las papayas disminuyó durante el almacenamiento (Tabla 1). Sin embargo, el contenido de ácido ascórbico fue mayor en las papayas recubiertas, presentando un contenido de ácido ascórbico de 15.47, 22.31 y 23.02 mg AA/g pulpa en el tratamiento control, A y B respectivamente, a los 15 d de almacenamiento. El contenido de ácido ascórbico en fruto está asociado con una función protectora, neutralizando las especies reactivas al oxígeno que son generadas durante la maduración (Özkan y Cemeroglu, 2004). Resende *et al.* (2012) reportaron que especies reactivas al oxígeno como el anión superóxido y peróxidos aumentan en el fruto durante la senescencia lo que se relaciona con una disminución de ácido ascórbico en las papayas control durante los últimos días de monitoreo. Por lo anterior, los recubrimientos retrasaron la senescencia en los frutos recubiertos y con ello lograron mantener mayor concentración de ácido ascórbico. Aunado a lo anterior, Pandey y Singh (1999) reportaron que la disminución de ácido ascórbico durante la maduración se atribuye a la oxidación del ácido ascórbico por el enzima ácido ascórbico oxidasa, por lo que una disminución de la transferencia de oxígeno provocado por los recubrimientos mantuvo mayor contenido de ácido ascórbico.

Concentración de plata en la pulpa de papaya

Los resultados mostraron que la plata migró del recubrimiento con alginato y nanopartículas de plata hacia el mesocarpio del fruto con un valor promedio de 0.373 ± 0.13 mg Ag/kg pulpa. Estos resultados son semejantes a los reportados por Pezzuto *et al.* (2015) quienes reportaron la migración de plata (0.103 mg/kg) de películas preformadas sintéticas a queso durante 24 d de almacenamiento. Diversos autores han reportado la toxicidad de la plata en forma de sal de plata y de nanopartículas de plata, sin embargo, en materia de regulación mundial aún hay controversia. Por ejemplo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2016) realizó una re-evaluación de la seguridad sobre el uso de la plata (colorante E 174) como aditivo alimentario. Estas autoridades reportaron que la información disponible era insuficiente para evaluar la inocuidad de E 174 como aditivo alimentario. Sin embargo, estos concluyeron que no existe ningún problema de seguridad para el consumidor si

la migración del ion plata no supera el límite de migración específica de 0.05 mg Ag/kg de alimento. Por lo anterior, el valor reportado en este trabajo es elevado por lo que es necesario disminuir la concentración de plata en el recubrimiento para evitar la migración de plata en niveles que superen estas recomendaciones. Es importante remarcar que, aunque el uso del recubrimiento adicionado con nanopartículas es controversial, los resultados en este trabajo mostraron que el uso de alginato extraído de *Sargassum fluitans* (sin la adición de nanopartículas de plata) como recubrimiento fue suficiente para prolongar la vida útil de la papaya a temperatura de 25 °C.

CONCLUSIONES

Los recubrimientos de alginato de sodio extraído de *Sargassum fluitans* adicionado o no con NpAg, retardaron al menos 6 días la maduración de la papaya almacenada a 25 °C y 75 % HR, manteniendo valores óptimos de firmeza, color, SST y ácido ascórbico durante 15 días de almacenamiento con respecto a las papayas control. Las papayas recubiertas con alginato y nanopartículas de plata presentaron concentraciones de plata superiores a la normatividad europea, por lo que se debe disminuir la concentración de plata en el recubrimiento. Sin embargo, los resultados demostraron que la aplicación de un recubrimiento a base únicamente de alginato prolongó la vida en anaquel de la papaya a temperaturas inferiores a 25 °C, por lo que estos resultados tienen una aplicación industrial.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece a CONACyT por la beca de doctorado N 563405. Al Tecnológico Nacional de México (TecNM) por el financiamiento otorgado al proyecto (14103.22-P). Los autores también agradecen a C. Chávez por su asistencia técnica durante la extracción de alginato de sodio, así como a Danna Cruz y Leslie García por su ayuda en el desarrollo experimental.

REFERENCIAS

- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists DC.
- Barrera, E., Gil, J., Restrepo, A., Mosquera, K. y Durango, D. 2015. Coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiiana). Revista Facultad Nacional de Agronomía. 68(2): 7667-7678. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n2.50982>
- Barrera, A.M.P., Pérez, M.S.R., González, J.G.B., Amaya-Guerra, C.A., Román, R.A. y Rodríguez, S.A.G. 2021. Recubrimiento comestible a base de alginato en combinación con eugenol nanoencapsulado y su efecto conservador en la vida útil de jitomate (*Solanum lycopersicum*). Biotecnia. 23(3): 134-141. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i3.1477>
- Barreto G.P.M., Fabi J.P., De Rosso V.V., Cordenunsi B.R., Lajolo F.M., do Nascimento J.R.O. y Mercadante A.Z. 2011. Influence of ethylene on carotenoid biosynthesis during papaya postharvesting ripening. Journal of Food Composition and Analysis. 24: 620-624. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.02.006>

- Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R. y Hernández-López, M. 2013. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection*. 49: 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>
- Borazjani, N.J., Tabarsa, M., You, S., y Rezaei, M. 2017. Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 101: 703-711. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.128>
- Carpita, N.C. y Giberaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. 3: 1-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.1993.tb00007.x>
- Castillo-Herrera, N., Hidalgo-Contreras, J.V. y Vequia, H.D.D. 2020. Bibliometric research of technology used in harvest and postharvest of papaya. *Horticulture International Journal*. 4(3): 68-73. <https://doi.org/10.15406/hij.2020.04.00160>
- Davis, T., Llanes, F., Volesky, B. y Mucci, A. 2003. Metal selectivity of *Sargassum spp.* and their alginates in relation to their a-L-guluronic acid content and conformation. *Environmental Science and Technology*. 37(2): 261-267. <https://doi.org/10.1021/es025781d>
- de Carvalho, L.M.J., Gomes, P.B., de Oliveira Godoy, R.L., Pacheco, S., do Monte, P.H.F., de Carvalho, J.L.V., Nutti, M.R., Lima-Neves, A.C., Alves-Vieira, A.C.R. y Ramos, S.R.R. 2012. Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata Duch*): A preliminary study. *Food Research International*. 47(2): 337-340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.040>
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food). 2016. EFSA J. 14(1): 4364-4427.
- Fabi, J.P. y Do Prado, S.B.R. 2019. Fast and furious: ethylene-triggered changes in the metabolism of papaya fruit during ripening. *Frontiers in Plant Science*. 10(535): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00535>
- Gómez, M.L.P.A., Lajolo, F.M. y Cordenunsi, B.R. 1999. Influence of gamma radiation on carbohydrates metabolism of ripening papaya (*Carica papaya* L. cv. Solo). *Food Science and Technology*. 19: 246-252. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611999000200017>
- Hamzah, H., Osmana, A., Tan, C. y Ghazli, F. 2013. Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). *Postharvest Biology and Technology*. 75: 142-146. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.08.012>
- Maringgal, B., Hashim, N., Tawakkal, I.S.M.A., Mohamed, M.T.M., Hamzah, M.H. y Shukur, N.I.A. 2019. The causal agent of anthracnose in papaya fruit and control by three different Malaysian stingless bee honeys, and the chemical profile. *Scientia Horticulturae*. 257: 108590. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108590>
- Martínez-Molina, E.C., Freile-Pelegrín, Y., Ovando-Chacón, S.L., Gutiérrez-Miceli, F.A., Ruiz-Cabrera, M.A., Grajales-Lagunes, A., Lujan-Hidalgo, M.C. y Abud-Archila, M. 2022. Development and characterization of alginate-based edible film from *Sargassum fluitans* incorporated with silver nanoparticles obtained by green synthesis. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 16: 126-136. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01156-6>
- Monzón-Ortega, K., Salvador-Figueroa, M., Gálvez-López, D., Rosas-Quijano, R., Ovando-Medina I. y Vázquez-Ovando A. 2018. Characterization of *Aloe vera*-chitosan composite films and their use for reducing the disease caused by fungi in papaya Maradol. *Journal of Food Science Technology*. 55:4747-4757. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3397-2>
- Özkan, M., Kirca, A. y Cemeroglu, B. 2004. Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. *Food chemistry*. 88(4): 591-597. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.011>
- Pandey, A.K. y Singh, I.S. 1999. Studies on preparation and preservation of guava ready-to-serve beverage. *Indian Journal of Horticulture*. 56(2): 130-132. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.128>
- Pezzuto, A., Losasso, C., Mancin, M., Gallochio, F., Piovesana, A., Binato, G., Gallina, A., Marangon, A., Mioni, R., Favretti, M. y Ricci, A. 2015. Food safety concerns deriving from the use of silver based food packaging materials. *Frontier in Microbiology*. 6: 1109. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01109>
- Raut-Rajesh, W., Lakkakula J.R., Kolekar N. S., Mendhulkar V.D. y Kashid S.B. 2009. Phytosynthesis of silver nanoparticle using *Gliricidia sepium* (Jacq.). *Current Nanoscience*. 5(1): 117-122. <https://doi.org/10.2174/157341309787314674>
- Resende, E.C.O., Martins, P.F., Azevedo, R.A.D., Jacomino, A.P. y Bron, I.U. 2012. Oxidative processes during 'Golden' papaya fruit ripening. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 24(2): 85-94. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202012000200002>
- Robles-Flores, G., Abud-Archila, M., Ventura-Canseco, L., Meza-Gordillo, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. y Gutiérrez-Miceli, F. 2018. Development and evaluation of a film and edible coating obtained from the *Cajanus cajan* seed applied to fresh strawberry fruit. *Food and Bioprocess Technology*. 11(12): 2172-2181. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2175-5>
- Rodrigues, J.P., de Souza Coelho, C.C., Soares, A.G. y Freitas-Silva, O. 2021. Current technologies to control fungal diseases in postharvest papaya (*Carica papaya* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 36: 102128. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102128>
- Rodríguez-Martínez, R., Brigitta, V. y Jordán-Dahlgren, E. 2016. Afluencia masiva de sargazo pelágico a la costa del Caribe mexicano (2014-2015). En *Florecimientos algales nocivos en México*. García-Mendoza E., Quijano-Scheggia S.I., Olivos-Ortiz A. y Nuñez-Vásquez E.J. (ed.), pp 352-365. Ensenada: CICESE.
- Rolim, W., Pelegrino, M., Araújo Lima, B., Ferraz, L., Costa, F., Bernardes, J. S. y Seabra, A. 2019. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science*. 463: 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203>
- Santamaría-Basulto, F., Sauri, D.E., Espadas, G.F., Díaz, P.R., Larqué, S.A., y Santamaría, J.M. 2009. Postharvest ripening and maturity indices for maradol papaya. *Interciencia*. 34(8): 583-588.
- Shen, Y.H., Yang, F.Y., Lu, B.G., Zhao, W.W., Jiang, T., Feng, L., Chen, X.J. y Ming, R. 2019. Exploring the differential mechanisms of carotenoid biosynthesis in the yellow peel and red flesh of papaya. *BMC Genomics*. 20(49): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5388-0>

- Vela-Gutiérrez, G., Zúñiga, E.J.L., Parra, E.G., García, E.L., Coronel, O.A.D.A. y López, A.A.V. 2019. Efecto de la luz roja y el contenido de nutrientes sobre la embriogénesis somática, enraizamiento y aclimatación a suelo de plantas de papaya maradol. *Biotecnia*. 21(1), 93-101. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i1.818>
- Vieira, A.C.F., de Matos-Fonseca, J., Menezes, N.M.C., Monteiro, A.R. y Valencia, G.A. 2020. Active coatings based on hydroxypropyl methylcellulose and silver nanoparticles to extend the papaya (*Carica papaya* L.) shelf life. *International Journal of Biological Macromolecules*. 164: 489-498. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.130>
- Yang, S. 1986. Regulation of biosynthesis and action of ethylene. Manipulation of ethylene responses in horticulture, *Acta Horticulturae*. 201: 53-60. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.201.6>
- Zhang, L., Huang, C. y Zhao, H. 2019. Application of pullulan and chitosan multilayer coatings in fresh papayas. *Coatings*. 9(11): 745. <https://doi.org/10.3390/coatings9110745>
- Zhou, L. y Paull, R.E. 2001. Sucrose metabolism during papaya (*Carica papaya*) fruit growth and ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 126(3): 351-357. <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.3.351>