



# Biotecnia

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



e-revist@s

PERIÓDICA  
ÍNDICE DE REVISTAS LATINOAMERICANAS EN CIENCIAS

indexada en

latindex

IC Journal  
Master List

reDalyC.org

SciELO

Miembro de

Crossref

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



<http://biotecnia.unison.mx>

**BIOTECNIA, 2023, 25, Número 1** (enero - abril), es una publicación electrónica cuatrimestral editada por la Universidad de Sonora, a través de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, con domicilio en Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col Centro, Hermosillo, Sonora, México, C.P.83000, página web: <https://www.biotecnia.unison.mx>, correo electrónico: [biotecnia@unison.ciencias.mx](mailto:biotecnia@unison.ciencias.mx). Editor responsable del número: Jesús Adriana Soto Guzmán.

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



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

# Contenido

## Artículos de revisión

- pp. 51 - 60 Inclusión dietaria de clinoptilolita como aditivo en la producción de rumiantes
- pp. 147 - 155 Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de *Yucca*: una revisión
- pp. 156 - 168 Fuentes dietarias, biodisponibilidad y efectos en la salud de carotenoides

## Artículos originales

- pp. 5 - 13 Composición química, actividad antioxidante y citotoxicidad de extractos de flores de *Magnolia grandiflora* L. encontradas en el sureste de México
- pp. 14 - 23 Estimación del riesgo microbiológico asociado al consumo de ostión crudo contaminado con *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*
- pp. 24 - 33 Antagonismo de cepas de *Trichoderma* aisladas en Tanaxuri, Michoacán, México contra patógenos del aguacate (*Persea americana* Mill)
- pp. 34 - 42 Efectividad biológica de extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* contra *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*.
- pp. 43 - 50 Caracterización fisicoquímica, tecno-funcional y antioxidante de la piel plateada del café
- pp. 61 - 66 Extractos polifenólicos de las hojas de *Ilex paraguariensis* y *Larrea divaricata* y su potencial antioxidante y antiCOVID-19
- pp. 67 - 80 Evaluación de consorcios micorrícicos arbusculares nativos en interacción con niveles de fósforo en la promoción del crecimiento y fotosíntesis de *Stevia rebaudiana* Bertoni
- pp. 81 - 87 Efecto de bioestimulantes microbianos en el tamaño y peso de frutos de chile morrón y jitomate en condiciones protegidas de macrotúnel
- pp. 88 - 93 Actividad antioxidante, tóxica y antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis*, *Ruta graveolens* y *Juglans regia* contra *Helicobacter pylori*
- pp. 94 - 99 *Trichoderma harzianum* y espinosina en el control de gorgojo del trigo *Sitophilus granarius* (L. 1758)
- pp. 100 - 108 Efecto de la estacionalidad en la calidad microbiológica y fisicoquímica de leche de cabra producida en el centro de Veracruz, México
- pp. 109 - 115 Desarrollo y caracterización de películas activas con nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis verde
- pp. 116 - 125 Evaluación de películas comestibles de quitosano, agar y tomillo para mantener la calidad de frutos de aguacate 'Hass' durante su almacenamiento
- pp. 126 - 132 Propuesta de un modelo de síndrome metabólico en ratones CD1 inducido con una dieta hipercalórica
- pp. 133 - 139 Factores asociados a la infección por el virus del papiloma humano en mujeres del noroeste de México
- pp. 140 - 146 Confiabilidad de PCR en punto final para el diagnóstico de fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en hisopado de piel y orina de pacientes hospitalizados en Sonora
- pp. 169 - 176 Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos y perfiles genéticos (ERIC-PCR) de especies *Enterococcus*, aislados de vísceras de pollo
- pp. 177 - 183 Influencia de la temperatura en la infectividad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* en *Vanilla planifolia* y en híbridos *V. planifolia* x *V. pompona*
- pp. 184 - 192 Rendimiento forrajero, grano y calidad del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) tipo Desi



# Chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of flower extracts from *Magnolia grandiflora* L. found in southeast Mexico

Composición química, actividad antioxidante y citotoxicidad de extractos de flores de *Magnolia grandiflora* L. encontradas en el sureste de México

Tomas Rivas-García<sup>1\*</sup>, Jorge Alberto Alejandro-Rosas<sup>2</sup>, Ángel Ramos-Ligonio<sup>2</sup>, Marisol Castillo-Morales<sup>2</sup>, Juan José Reyes-Pérez<sup>3</sup> y Berenice Esquivel-Valenzuela<sup>4</sup>

<sup>1</sup> CONACYT-Universidad Autónoma Chapingo, Carretera Federal México-Texcoco km 38.5, San Diego 56230, México.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Oriente 6 1009, Col. Rafael Alvarado, Orizaba 94340, Veracruz, México.

<sup>3</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Av. Quito Km 1.5 Vía a Santo Domingo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

<sup>4</sup> Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Carretera Gómez Palacio-Ciudad Juárez, domicilio conocido, Bermejillo 35230, Durango, México.

## ABSTRACT

Some reports state that different structures of *M. grandiflora* contain bioactive components. Nonetheless, phytochemical studies reported that the extracted essential oils are chemically different and remarkably variable in their qualitative and quantitative compositions. Further studies on the Mexican *M. grandiflora* needs to be done. Thus, the research aimed to characterize a) the chemical composition, b) the antioxidant activity and c) cytotoxicity effect of two *M. grandiflora* flower extracts. The chemical composition was evaluated by phytochemical test followed by thin layer chromatography, UV-Vis and FTIR spectrophotometer analysis. The antioxidant activity of the flower extracts was measured by the free radical-scavenging activity (ABTS) and the stable radical of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) methods, and the cytotoxicity by an *Artemia salina* bioassay. Water and ethyl flower extracts showed the presence of organic chromophores such as flavonoids. Both extracts (ethyl and water) demonstrated antioxidant activity by both ABTS ( $459.6 \pm 8.5$  and  $274.2 \pm 5.7$   $\mu\text{mol TE/g}$ , respectively) and DPPH ( $3210.4 \pm 2.5$  and  $219.7 \pm 0.9$   $\mu\text{mol TE/g}$ , respectively) methodologies, and non-cytotoxic activity ( $\text{LC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $1285 \pm 14$  and  $1116 \pm 15$ , respectively). The water and ethyl extracts of *M. grandiflora* flowers found in southeast Mexico are a promissory source of chemical compounds with attributed biological activity according to the presented results.

**Key words:** Bioactive compounds; Biological activity; Medicinal plants.

## RESUMEN

Algunos estudios afirman que diferentes estructuras de *M. grandiflora* contienen componentes bioactivos. No obstante, los estudios fitoquímicos indican que los aceites esenciales extraídos son químicamente diferentes y notablemente variables en sus composiciones cualitativas y cuantitativas. Es necesario realizar más estudios sobre *M. grandiflora* cultivada en México. Por ello, el objetivo de esta investigación fue caracterizar a) la composición química,

b) la actividad antioxidante y c) el efecto citotóxico de dos extractos de flores de *M. grandiflora*. La composición química se evaluó mediante una prueba fitoquímica preliminar seguida de cromatografía en capa fina y análisis espectrofotométrico mediante UV-Vis y FTIR. La actividad antioxidante de los extractos de flores se midió por el método de la actividad reductora de radicales libres (ABTS) y el método de radicales estables de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) y la citotoxicidad por un bioensayo de *Artemia salina*. Los extractos acuoso y etílico de flores mostraron la presencia de cromóforos orgánicos como los flavonoides. Ambos extractos (etílico y acuoso) demostraron actividad antioxidante tanto por ABTS ( $459.6 \pm 8.5$  y  $274.2 \pm 5.7$   $\mu\text{mol TE/g}$ , respectivamente) y DPPH ( $3210.4 \pm 2.5$  y  $219.7 \pm 0.9$   $\mu\text{mol TE/g}$ , respectivamente); y actividad no citotóxica ( $\text{CL}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $1285 \pm 14$  y  $1116 \pm 15$ , respectivamente). Los extractos acuosos y etílicos de las flores de *M. grandiflora* encontradas en el sureste de México son una fuente promissoria de compuestos químicos con actividad biológica atribuida por los resultados presentados.

**Palabras clave:** Actividad biológica; Compuestos bioactivos; Plantas medicinales

## INTRODUCTION

The family Magnoliaceae consists of 12 genera with approximately 210 flowering plant species (Morshedlo *et al.*, 2017). *Magnolia grandiflora* is a genus distributed in tropical-subtropical regions on America and Asia as ornamental trees, with economic importance as a source of aromatic large cup-shaped flowers (Lee *et al.*, 2011; Farag and Al-Mandy, 2013). It has been used in American, Asian and Indian traditional medicine for centuries with attributed properties such as anxiety, nervous disturbance and pain controller, as well as antiseptic agent, diaphoretic, anti-inflammatory, antiseptic, and stimulant agent (Latif *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2020). In Mexican traditional medicine it has been used as treatment against epilepsy, spasms, inflammatory and infertility diseases (Dominguez-Yescas and Vázquez-García, 2019).

\*Autor para correspondencia: Tomas Rivas-García  
 Correo electrónico: tomas.rivas@conacyt.mx

Recibido: 21 de abril del 2022

Aceptado: 13 de septiembre de 2022



Many reports state that different plant structures of *M. grandiflora* contain active compounds such as sesquiterpenoids (Hong *et al.*, 2007), coumarins (Hussein and El-Anssary, 2019), phenylpropanoids (Cao *et al.*, 2021), lignans (Schühly *et al.*, 2009), glycosides (Wang *et al.*, 2019), alkaloids (Cho *et al.*, 2022), among others (Lim, 2014). These compounds have demonstrated biological activities such as antitumor (Chilampalli *et al.*, 2011), antimicrobial (Chang *et al.*, 1998), anti-inflammatory (Kim and Cho, 2008), anti-tyrosinase (Huang *et al.*, 2012), anti-allergic (Niitsuma *et al.*, 2001), cardioprotective (Ho and Hong, 2012) and antiviral (Lan *et al.*, 2012) activities. Moreover, in the cosmetic industry, *M. grandiflora* is used because of its anti-inflammatory and anti-acne activities exerted by its biphenols magnolol and honokiol active compounds (Mukherjee *et al.*, 2011).

Flowers of *M. grandiflora* are an important source of essential oils which are extracted with aqueous and alcoholic based techniques (Davé *et al.*, 2012). These volatile floral substances are mainly monoterpenoids, sesquiterpenoids and phenylpropanoids formed by the mevalonato-methyl erythritol phosphate (MEP) and shikimate pathways (Averesch and Krömer, 2018). The most common reported chemical constituents in *M. grandiflora* flowers are  $\beta$ -elemene, germacrene, bicyclogermacrene, D,  $\beta$ -elemene, (*E*)- $\beta$ -ocimene,  $\beta$ -Caryophyllene, cyclocolorenone and geraniol (Baez *et al.*, 2012; Davé *et al.*, 2012; Lim, 2014; Morshedloo *et al.*, 2017). The antioxidant capacity exerted by many of these compounds was effective against cancerous cell proliferation without cytotoxicity (Li *et al.*, 2009; Farag and Al-Mahdy, 2013; Raut and Karuppaiyil, 2014).

Nonetheless, phytochemical studies reported that the extracted essential oils are chemically different and remarkably variable in their qualitative and quantitative compositions (Morshedloo *et al.*, 2017) due to methods of extraction, environmental conditions, developmental stages of flowers and genetic factors (Lim, 2014). Moreover, further studies regarding chemical compositions, antioxidant capacity and cytotoxicity of Mexican *M. grandiflora* flowers to evaluate its potential applications are necessary (Sánchez-Recillas *et al.*, 2014; Vázquez-García *et al.*, 2015). Hence, the objective of the present study was to characterize a) the chemical composition, b) the antioxidant activity and c) cytotoxicity effect of two *M. grandiflora* flower extracts.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and chemicals

Flowers of *M. grandiflora* were collected during a rain period on June 2018 from cultivated trees in the Orizaba, Veracruz Faculty of Chemical Sciences at Universidad Veracruzana. The collected flowers were located on tomentose pedicels, erect, solitary, large, up to 20 cm in diameter. They had 6-12 white petals, narrowed at the base, and three sepals with a petaloid appearance, as well as both reproductive organs in the same flower. Guidelines on Good Agricultural and Harvesting Practices (GAP) for medicinal plants were followed (WHO, 2003). All the chemicals and solvents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### Plant extracts preparations

The *M. grandiflora* flowers were washed and then air-dried. The plant material was homogenized in a mortar and then sieved using a 3.2 mm sieve. In order to obtain 2 % (m/v) aqueous and ethyl extracts, 2 g of plant material were mixed with 100 mL of double distilled water (DDW) or 100 mL of ethyl alcohol (96 %), respectively. The aqueous extract was heated to boil for 10 min, filtered with qualitative filter paper disks (Munktell, grade 388), and then concentrated by lyophilization for a week (lyophilizer, LABCONCO). The ethyl extract was hot continuous percolated over 72 h using Soxhlet apparatus, filtered with qualitative filter paper disks, and then concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator (Buchi, RE111). The flower plant extracts were stored in amber flasks at 4 °C until use.

### Preliminary phytochemistry of plant extracts

The preliminary phytochemical properties of the flower extracts were examined for the presence of alkaloids (Dragandroff's reagent, Wagner's reagent and Sonneschain's reagent) flavonoids (Shinoda test and Zinc-Hydrochloride test), glycosides (Legal test, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> test and Borntrager's test), saponins (Froth forming test), tannins (FeCl<sub>3</sub> test, Vanillin-Hydrochloride test and alkaline test) and triterpenoids (Lieberman test, Salkowsky test and Noller test), as described by Okeulu and Chinwe (2001). All tests were performed in triplicate.

### Qualitative analysis by thin layer chromatography

Thin layer chromatography (TLC) on analytical plates over 10 cm x 20 cm silica gel 60 (Art. 1.05641) was performed in order to separate the plant extracts metabolites. Different solvent systems with different polarities were prepared and TLC studies performed to select the solvent system for a better resolution. The methodology was performed as follows: 1) Flower extracts solutions were applied on 6 mm bands, 5 mm from the bottom, 12 mm from the left edge, 4 mm apart by means of Linomat IV (Camag) on pre-coated (0.25 mm layer, Merck) TLC plates by using capillary tubes, 2) TLC was developed in a crystal chamber using hexane-Ethyl acetate (5:5 and 2:8), 3) TLC plates were dried with Camag TLC plate heater at 110 °C for 20 min, and observed under ultra violet light at 254 and 365 nm respectively, 4) Then, they were sprayed with iodine and vanillin solutions as spraying reagents, 5) Finally, the development of color in separated bands was analyzed and expressed by its retention factor (R<sub>f</sub>) with the formula:

$$R_f = \frac{\text{Distance travel by solute}}{\text{Distance travel by solvent}} \quad (1)$$

### UV-VIS and FTIR spectroscopic analysis

Flower extracts were examined under visible and UV light for proximate analysis. For UV-VIS and FTIR spectrophotometer analysis (Karpagasundari and Kulothungan, 2014), the flower plant was centrifuged at 3000 rpm for 10 min and filtered through Whatman No. 1 filter paper with a high-pressure vacuum pump. The sample was diluted 1:4 with

the aqueous and methanol solvents respectively. The flower extracts were scanned within a wavelength range of 200-800 nm using a CARY 50 VARIAN (Amsterdam, The Netherlands) and the characteristic peaks were detected. The peak values from the UV-VIS and FTIR were recorded and the analysis repeated twice for the spectrum confirmation.

### **In vitro antioxidant activity**

The flower extracts of *M. grandiflora* were tested for *in vitro* antioxidant activity by the standard methods. The total phenols content was quantified by the Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965). An aliquot (0.5 mL) of each diluted polar extract was mixed with deionized water (35 mL) and 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent; after 3 min of incubation, a sodium carbonate solution (20 % in water) (5 mL) was added. The solution was incubated at 70 °C for 20 min and then adjusted to 50 mL with deionized water. The UV-VIS absorbance was read at 750 nm (CARY 50 VARIAN; Amsterdam, The Netherlands). The results were expressed as mg gallic acid equivalent per gram of dry weight (mg GAE/g DW). For calibration curve, gallic acid concentrations were used between 0.05 - 0.5 mg/mL ( $R^2 = 0.99$ ).

The method described by Medda *et al.* (2021) with some modifications was used to quantify the ABTS radical scavenging activity. The ABTS<sup>+</sup> cation radical was produced by mixing ABTS stock solution (7 mM in water) and 2.45 mM potassium persulfate at a 1:0.5 ratio respectively, and stored in the dark at room temperature for at least 16 h before use. The ABTS radical was diluted with water until an absorbance at 734 nm reached a 0.7 value. The ABTS solution was prepared fresh before each analysis. Each flower extract (7.5 µL) was mixed with 1000 µL of ABTS diluted. The reaction mix was incubated for 30 min in the dark at room temperature and the absorbance was immediately read at 734 nm using a CARY 50 Scan UV143 Vis VARIAN spectrophotometer (Amsterdam, The Netherlands). The calibration curve was prepared using a range of 0 - 4 mM ( $R^2 = 0.98$ ) of Trolox reagent. The radical scavenging activity was estimated by the decrease of absorbance and expressed as the Trolox equivalent (TEAC) ABTS per mL of essential oil or component as follows:

$$\% \text{ of ABTS inhibition} = \frac{(C_{abs} - S_{abs})}{C_{abs}} \times 100 \quad (2)$$

Where  $C_{abs}$  is the control absorbance at  $t = 0$  (containing all reagents except the test compound), and  $S_{abs}$  is the sample absorbance of the test compound after 30 min. The results were expressed in µmol TE/g extract. All determinations were performed in triplicate. Antioxidant activity was expressed as  $IC_{50}$ , defined as the concentration of the test material required to cause a 50 % decrease in initial ABTS concentration.

The antioxidant activity of the flower extracts was also measured by the stable radical of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method (Brand-Williams *et al.*, 1995). DPPH radical solution (100 µM) in 80 % (v/v) aqueous methanol

was prepared. Test samples were prepared by mixing each flower extract (10 µL) and DPPH solution (190 µL), mixed, and then incubating in the dark at 37 °C for 20 min. All tests were performed in triplicate, with vitamin E as a positive control. The absorbance values were measured at 517 nm against a methanol blank (CARY 50 Scan Uv143 Vis VARIAN; Amsterdam, The Netherlands). Trolox was used as a standard for calibration curve (range between 6 - 21 µM;  $R^2 = 0.97$ ). The % of inhibition was calculated with the formula:

$$\% \text{ of DPPH inhibition} = \frac{(C_{abs} - S_{abs})}{C_{abs}} \times 100 \quad (3)$$

Where  $C_{abs}$  is the control absorbance at  $t = 0$  (containing all reagents except the test compound), and  $S_{abs}$  is the sample absorbance of the test compound after 20 min. The results were expressed in µmol Trolox equivalent for g extract (µmol TE/g extract). Antioxidant activity was expressed as  $IC_{50}$ , defined as the concentration of the test material required to cause a 50 % decrease in initial DPPH concentration.

### **Cytotoxicity bioassay**

For determining the cytotoxicity of flower extracts, a brine shrimp (*Artemia salina*) lethality bioassay was carried out (Krishnaraju *et al.*, 2005). Brine shrimp were hatched using brine shrimp eggs in a conical flask (1 L) with sterile seawater (38 g/L, pH 8.5 adjusted with  $Na_2CO_3$ ) with aeration. After 24 h, 15 mL of yeast solution 0.06 % was added to the conical flask as larvae feeding; 48 h after the egg's incubation, active nauplii free from eggshells were collected, counted and placed in each vial containing 4.5 mL of brine solution. After 24 h of exposure to different concentrations (1 - 5,000 µg/mL) of the flower plant extracts (in triplicate per dose), surviving larvae were counted. The lethality (%) was determined by comparing the mean surviving nauplii and control tubes. The  $LC_{50}$  values were obtained from the best-fit line plotted concentration vs percentage lethality. Potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ) was used as positive control in the bioassay. Sterile seawater was used as negative control.

### **Data treatment and statistical analysis**

Data are expressed as the means of three biological replicates. Results of phenolic compounds, ABTS<sup>+</sup> and cytotoxicity determinations are expressed as the means and standard deviations of three replicates. When needed, results were compared using an analysis of variance (ANOVA) with STATISTICA software (StatSoft 10.0; Tulsa, Ok, USA). Significant difference Fisher test ( $p \leq 0.05$ ) was used to compare means.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Preliminary phytochemistry of flower extracts**

In the preliminary phytochemical analysis of the flower extracts, the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, glycosides, coumarins, quinones, sesquiterpene lactones, saponins, and triterpenoids were examined (Table 1). The re-

**Table 1.** Phytochemical tests to determine metabolites from water and ethyl extracts.**Tabla 1.** Ensayos fitoquímicos para determinar metabolitos a partir extractos acuosos y etílicos.

Metabolites	Test	Water extract	Ethyl extract
Alkaloids	Dragandroff	-*	-
	Wagner	+	+
	Sonneschain	-	-
Flavonoids	Shinoda	-	-
	Zinc-Hydrochloride	+	++
Tannins	FeCl <sub>3</sub>	++	+++
	Vanilin-Hydrochloride	-	-
	Alkaline	-	-
Glycosides	Borotrager	-	-
	Legal	-	-
	Baljet	-	-
Coumarins	Erlich	-	-
	NH <sub>4</sub> OH	-	-
	NaOH	-	-
Quinones	NaOH	-	-
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-
Sesquiterpene lactones	Lactones	-	-
Saponins	Saponins	+	+
Triterpenoids	Lieberman	-	-
	Salkowsky	-	+++

\* The preliminary results of secondary metabolites recognition are expressed with the symbols (+) and (-), where (+ + +) indicates a fairly marked presence of the reaction and (-) indicates the absence of the metabolite.

sults of the preliminary phytochemical tests were compared in both extracts, differing only in two metabolites. Flavonoids and triterpenoids test showed marked presence on the ethyl extract. Positive results were obtained in the alkaloid reaction using Wagner's reagent for both samples. Serna-González and Guzman-Vazquez (2010) stated that alkaloids from Magnoliaceae family have relaxing properties. Meanwhile, the reaction for flavonoids and tannins indicates the presence of phenolic compounds which confirms a great variety of biological properties, such as antitoxic, antitumor, antiviral, antimicrobial, anti-inflammatory, antibacterial, antiallergic, fungicidal and insecticidal, among others (Tungmunnithum *et al.*, 2018).

Positive results were obtained for saponins, presenting a moderate content of this metabolite, which has not been reported in studies previously carried out with *M. grandiflora*. As it is known, in the literature saponins may be associated with numerous biological activities that include anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and antiviral (Troisi *et al.*, 2014). Although the presence in *M. grandiflora* is moderate, it could have an influence on its anti-inflammatory and antibacterial effects.

Triterpenoids test with the Salkowski reagent fairly marked positive (+++) with the ethyl extract. Triterpenes are from the family of terpenes, and there are previously reported sesquiterpenoids and triterpenes in *M. grandiflora* (Del Valle *et al.*, 2004). This metabolite was only found in the alcoholic extract, which may indicate that has a higher affinity for alcohol. The previous situation also occurred when performing the glycosides test, giving only positive for the aqueous extract with the Baljet reaction, but negative results were obtained with the alcoholic extract. Glycosides have been used to treat congestive heart failure (Ávalos-García and Pérez-Urria, 2009). This result is related with the study carried out by Del Valle *et al.* (2004) entitled "Studies of *M. grandiflora* extracts on guinea pig heart muscle", which mentions that the crude extracts of leaves and petals of *M. grandiflora* have a positive inotropic effect for the heart, as well as a coronary vasodilation. According to this, in several regions of Mexico, *M. grandiflora* is known for its effect on diseases of the heart, which is one of his greatest recognitions in herbal medicine.

### Qualitative analysis by thin layer chromatography

Thin-layer chromatography was performed in order to obtain a separation of metabolites present in the flower extracts of *M. grandiflora*. Hexane: Ethyl acetate was used as the mobile phase, at different concentrations (5:5 and 2:8). Each separate analyte was marked and the distance traveled by each one was measured to calculate its Rf. The values obtained from both extracts are shown in Table 2. The preliminary results of the RF at the 5:5 dilution indicate the possible presence of one isolated analyte, and at the 2:8 dilution the presence of two isolated analytes in both extracts is shown, corroborated with the three repetitions performed, since there is not much difference between their Rf. These 3 different metabolites are due to the fact that the dilutions are of different polarity. The 2:8 dilutions are more polar than the 5:5 dilutions. Thus, we can observe the separation of more analytes. The more retained analytes near the origin tend to be of higher polarity since they are fixedly adsorbed to the active centers of the stationary phase, in this case silica gel, whereas the nonpolar ones will elute more easily (Sherma and Fried, 2003). The advantage of thin-layer chromatography as a preliminary analysis technique for extracts should be highlighted, since it gives us an idea of their composition (Qu *et al.*, 2018).

### UV-VIS and FTIR spectroscopic analysis

The UV-VIS analysis was performed to identify phytoconstituents present in ethyl and water extracts of *M. grandiflora*. The mentioned analysis was performed to identify the chemical compounds that contains  $\sigma$ -bonds,  $\pi$ -bonds and lone pair of electrons, chromophores and aromatic rings. The qualitative UV-VIS profile of both *M. grandiflora* extracts were determined between the wavelengths of 200 nm and 800 nm, in order to obtain a proper baseline and due to the peaks and sharpness. The performed analysis of ethyl extract showed peaks at 260 nm and 360 nm respectively (Figure 1a).



**Table 2.** Qualitative analysis by thin layer chromatography results of the Rf obtained both solutions.

**Tabla 2.** Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina de los resultados de la Rf obtenida de ambas soluciones.

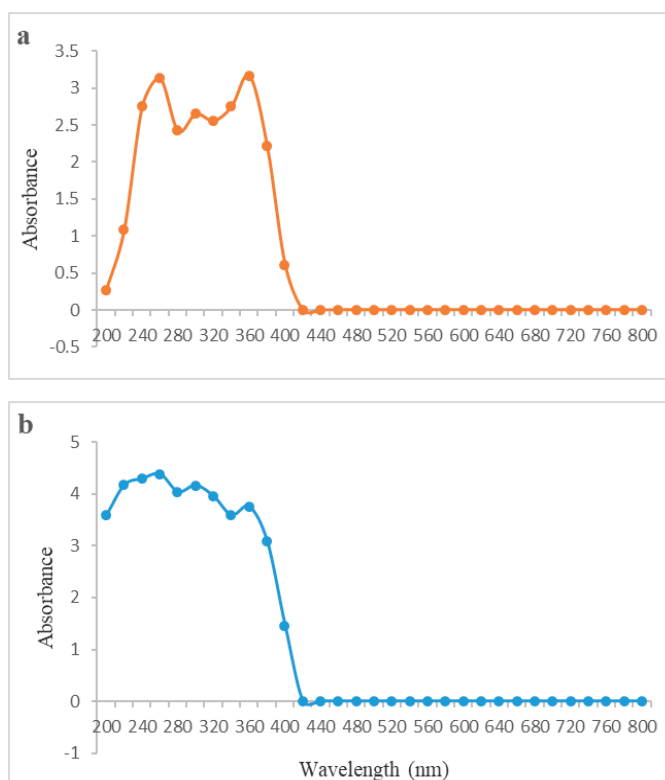
2:8 Dilution			
		Distance (cm)	Rf*
Ethyl extract	A1	1.5	0.254
	A2	1.7	0.309
	A3	1.7	0.309
	B1	4	0.678
	B2	4.7	0.855
	B3	4.8	0.873
Water extract	A1	1.4	0.237
	A2	1.7	0.309
	A3	1.9	0.345
	B1	4.1	0.695
	B2	4.8	0.873
	B3	4.8	0.873
5:5 Dilution			
		Distance (cm)	Rf
Ethyl extract	A1	2.4	0.421
	A2	4.1	0.745
	A3	4.1	0.745
Water extract	A1	3.2	0.582
	A2	3.9	0.709
	A3	3.9	0.709

\* The retention factor (RF) is the result of (a) the distance of flower extract divided by (b) the distance of the eluent over the thin layer chromatography.

\* El factor de retención (RF) es el resultado de (a) la distancia del extracto floral dividida por (b) la distancia del eluyente sobre la cromatografía en capa fina.

While the performed analysis of water extract showed peaks at 240 nm, 260 nm and 360 nm respectively (Figure 1b). The absorption spectrum of the *M. grandiflora* flower extract from the 400 nm to 800 nm region was not detectable.

In this analysis the peaks of absorbance at 200 to 400 nm are correlated to the presence of unsaturated groups and heteroatoms such as O, S, N (Njoku *et al.*, 2013). In both ex-



**Figure 1.** UV-VIS wavelength absorbance analysis of *M. grandiflora* flower extracts. a) ethyl extract; b) water extract.

**Figura 1.** Análisis de absorbancia de longitud de onda UV-VIS de extractos de flores de *M. grandiflora*. a) extracto de etílico; b) extracto acuoso.

tracts, the spectrum shows many peaks from 300 nm to 400 nm which confirms the presence of organic chromophores within the *M. grandiflora* flower extracts. Nonetheless, the UV-VIS analysis has some limitations by the inherent difficulties to record the peaks to any particular constituents in the system. The UV-VIS results should be complemented with any other analytical technique such as FTIR and GC/MS techniques to a proper extract characterization and constituent identification (Karpagasundari and Kulothungan, 2014).

The FTIR spectrum was performed to identify the functional group of the active components based on the peak absorbance detected at the infrared radiation. The FTIR spectrum of the *M. grandiflora* flower extracts in the form of wave numbers ( $\text{cm}^{-1}$ ) are shown in table 3. The wave absorption numbers at 3,348.22 and 3,428.32 are due to the stretching hydroxyl groups (Pramila *et al.*, 2012). The band at 2,930.02 is due to symmetric stretching of saturated ( $\text{sp}^3$ ) carbon (Karpagasundari and Kulothungan, 2014). The bands at 1,579.98 and 1,629.78 are assigned to the bending mode of absorbed water, since plant extracts even ethyl extracts are known to have a strong affinity for water (Oliveira *et al.*, 2016). The bands at 1,550.02 and 1,540.02 are due to  $\text{C}=\text{C}$  stretching related to the aromatic structure of both extracts (Al-Shareefi *et al.*, 2019). The vibrational absorption band at 1,402.22 was related to rocking of methyl group (Ashokkumar *et al.*, 2014). A band at 1,253.97 was related to  $\text{C}-\text{O}$  stretching (Oliveira *et al.*, 2016). The bands at 577.97 and 587.97 were due to the aromatic ring out of plane bending (Carballo *et al.*, 2008).

**Table 3.** Structural features of *M. grandiflora* flower extracts by FTIR.**Tabla 3.** Características de la estructura de extractos de flores de *M. grandiflora* por FTIR.

Ethyl extract	Wave numbers (cm <sup>-1</sup> )	Assignments
	3,348.22	-OH stretch
	1,579.98	Alkene C=C
	1,550.02	C=C stretching
	577.97	Aromatic ring
Water extract		
	3,428.32	-OH stretch
	2,930.02	C-H stretch
	1,629.78	Alkene C=C
	1,540.02	C=C stretching
	1,402.22	C-H bending
	1,253.97	C-O stretch
	587.97	Aromatic ring

### In vitro antioxidant activity

Extracts of aromatic plants are known to have antioxidant properties, thus this offers the possibility of being used as natural preservatives for food and cosmetics (Bendif et al., 2017). In the present study, the antioxidant activity of *M. grandiflora* flower extracts was investigated (Table 4). In general, the antioxidant activity of plant extracts is primarily due to phenolic compounds and, in *M. grandiflora* flower extracts, the presence of different groups of phenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids, and diterpenoids, are responsible for the observed antioxidant properties (Elansary et al., 2019). The total phenolic content (TPC) (expressed as gallic acid equivalents) is often used as an approximately measurement of the antioxidant power of a plant extract (Wu et al., 2018). The TPC values reported for both *M. grandiflora* flower extracts, which were determined by the Folin-Ciocalteu assay, are also reported in table 4. From the obtained data, slight differences in TPC values can be observed between water and ethyl extracts, with the former exhibiting the highest TPC. These results are consistent with the concentrations of the major chemical compounds showed in table 1.

The flower extracts showed moderate antioxidant activity as reported in all the assays where Trolox was used as reference. The greater antioxidant activity observed in ethyl *M. grandiflora* flower extracts could be attributed to their phytochemical properties (Tables 1-3) and/or to their synergistic effects (Garza et al., 2019). Elansary et al. (2019), also concluded that *Magnolia acuminata* had the highest antioxidant activity in comparison with other plant extracts; which was attributed to phytochemicals such as catechin and catechin derivatives.

The antioxidant activity of the flower extracts was measured by the ABTS and DPPH methods. The relatively stable nitrogen-centered free radical DPPH is ubiquitously used to measure the scavenging ability of different phytochemicals, extracts or essential oils and their antioxidant

**Table 4.** Antioxidant activity of *M. grandiflora* ethyl and water flower extracts.

**Tabla 4.** Actividad antioxidante de extractos etílicos y acuosos de flores de *M. grandiflora*.

Extracts	Polyphenols (mg GAE/g dw)	ABTS		DPPH	
		TEAC <sup>*</sup> (μmol TE/g)	IC50 <sup>#</sup> (μg/mL)	TEAC <sup>*</sup> (μmol TE/g)	IC50 <sup>#</sup> (μg/mL)
Ethyl	46.8 ± 3.2 <sup>2#</sup>	459.6 ± 8.5 <sup>a</sup>	39.4 ± 1.5 <sup>b</sup>	3,210.4 ± 2.5 <sup>a</sup>	54.5 ± 1.1 <sup>b</sup>
Water	34.3 ± 1.3 <sup>b</sup>	274.2 ± 5.7 <sup>b</sup>	51.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	219.7 ± 0.9 <sup>b</sup>	63.3 ± 0.4 <sup>a</sup>
Control			3.8 ± 0.4 <sup>c</sup>		3.02 ± 0.2 <sup>c</sup>

<sup>\*</sup>TEAC: Trolox equivalent (TE) antioxidant concentration.

<sup>#</sup>IC<sub>50</sub>: The concentration giving a reduction of 50 %.

<sup>†</sup>Each value is the mean of three replicates ± Standard deviation. Different letters mean significant difference (Fisher, p ≤ 0.05).

<sup>\*</sup>TEAC: Concentración antioxidante de Equivalentes Trolox (TE).

<sup>#</sup>IC<sub>50</sub>: La concentración necesaria para reducir el 50 %.

<sup>†</sup>Cada valor es la media de tres repeticiones ± Desviación estándar. Letras diferentes significan diferencia significativa (Fisher, p ≤ 0.05).

effects on DPPH radical depend on their hydrogen donating ability (Dastmalchi et al., 2007). The water extract of *M. grandiflora* flowers reduced the concentration of DPPH by 72.09 ± 6 % with an efficacy higher than that of the ethanolic extract (63.5 ± 7 %). Vitamin E, included as positive control in the assay, showed the greatest ability to scavenge the DPPH free radical (88 ± 8 %) at the same test concentrations of 5 mg/mL. As previously mentioned, both flower *M. grandiflora* extracts have mainly components such as terpenes and phenolic compounds, and it can be assumed that these are responsible for the high percentage of ABTS and DPPH inhibition (Yoon, 2014). Moreover, flower extracts from other Magnoliaceae species have chemical antioxidant compound such as honokiol and magnolol (Yang et al., 2018).

### Cytotoxicity bioassay

A brine shrimp (*Artemia salina*) lethality bioassay was carried out to determine the cytotoxicity of flower extracts. Table 5 shows the LC<sub>50</sub> of the flower *M. grandiflora* extracts. Both, water and ethyl extracts, did not show toxicity with LC<sub>50</sub> higher than 1,000 μg/mL, unlike control, as expected, considered as cytotoxic due to a LC<sub>50</sub> lower than 100 μg/mL (Yadav and Mohite, 2020). There is information about cyto-

**Table 5.** Cytotoxicity test by lethality brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. **Tabla 5.** Prueba de citotoxicidad por bioensayo de letalidad en camarones en salmuera (*Artemia salina*).

Flower plant extract	LC <sub>50</sub> (μg/mL)
Water extract	1,116 ± 15 <sup>b*</sup>
Ethyl extract	1,285 ± 14 <sup>a</sup>
Control (+)	10.3 ± 1.7 <sup>c</sup>
Negative (-)	0

LC<sub>50</sub>: Lethal concentration to kill 50 % of brine shrimp. LC<sub>50</sub> < 100 μg/mL means toxicity level. \*Each value is the mean of three replicates ± Standard deviation. Different letters mean significant difference (Fisher, p ≤ 0.05).

DL<sub>50</sub>: Concentración letal para matar el 50 % de las artemias. DL<sub>50</sub> < 100 μg mL<sup>-1</sup> significa un nivel de toxicidad. \*Cada valor es la media de tres repeticiones ± Desviación estándar. Letras diferentes significan diferencia significativa (Fisher, p ≤ 0.05).

toxicity test of *M. grandiflora* flower extracts carried out by *Artemia salina* bioassays. Nonetheless, Martínez-Báez *et al.* (2016) found a moderate cytotoxicity with a LC<sub>50</sub> of 400 µg/mL, in a methanolic *M. grandiflora* plant extract. In our results, the non-cytotoxicity of both flower extracts could be related to some phenolic compounds such as magnolol which has cytoprotective activity (Zhang *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONS

The preliminary phytochemical test demonstrated the presence mainly of flavonoids, terpenes, tannins and alkaloids in both extracts. The thin layer chromatography, the UV-Vis and FTIR spectroscopic analyses showed the presence of organic chromophores such as flavonoids. The water and ethyl flower extracts showed antioxidant and non-cytotoxic activity. The water and ethyl extracts of *M. grandiflora* flowers found in southeast Mexico are a promissory source of chemical compounds with the attributed biological activities by the presented results. Nonetheless, ethyl extracts exerted more antioxidant activity. *M. grandiflora* flower extracts could be used in medicinal and cosmetic industries by their exerted chemical antioxidant properties and by their non-cytotoxic effects.

## REFERENCES

- Al-Shareefi, E., Sahib, A.H.A. and Hameed, I.H. 2019. Phytochemical Screening by FTIR Spectroscopic analysis and anti-fungal activity of fruit extract of selected medicinal plant of Rutagraveolens. *Indian Journal of Public Health Research & Development*. 10(1): 994-999. <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2019.00190.6>
- Ashokkumar, R. and Ramaswamy, M. 2014. Phytochemical screening by FTIR spectroscopic analysis of leaf extracts of selected Indian medicinal plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(1): 395-406.
- Ávalos-García, A. and Pérez-Urria Carril, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*. 2(3): 119-145.
- Averesch, N.J. and Krömer, J.O. 2018. Metabolic engineering of the shikimate pathway for production of aromatics and derived compounds—present and future strain construction strategies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 6, 32. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00032>
- Bendif, H., Boudjeniba, M., Miara, M. D., Biqiku, L., Bramucci, M., Caprioli, G. and Maggi, F. 2017. *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*. 218, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.063>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 28(1): 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cao, Y.G., Li, H.W., Cao, B., Wang, J.C., Zhang, Y.L., Zhao, X. and Feng, W.S. 2021. Two new phenylpropanoids and a new dihydrostilbenoid from the flower buds of *Magnolia biondii* pamp and their acetylcholinesterase inhibitory activities. *Natural Product Research*. 35(19): 3233-3240. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1693567>
- Carballo, T., Gil, M.V., Gómez, X., González-Andrés, F. and Morán, A. 2008. Characterization of different compost extracts using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermal analysis. *Biodegradation*. 19(6): 815-830. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9184-4>
- Chilampalli, C., Guillermo, R., Kaushik, R.S., Young, A., Chandrasekher, G., Fahmy, H. and Dwivedi, C. 2011. Honokiol, a chemopreventive agent against skin cancer, induces cell cycle arrest and apoptosis in human epidermoid A431 cells. *Experimental Biology and Medicine*. 236(11): 1351-1359. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011030>
- Cho, H.M., Park, E.J., Park, Y.J., Ponce-Zea, J., Doan, T.P., Ryu, B. and Oh, W.K. 2022. Sesquiterpene lactone and its unique proaporphine hybrids from *Magnolia grandiflora* L. and their anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*. 200: 113211. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113211>
- Dave, P.C., Vogler, B. and Setzer, W.N. 2012. Composition of the floral essential oil of *Magnolia grandiflora* L. (Magnoliaceae): intraspecific and floral maturity variations. *Journal of Essential Oil Bear Plant*. 15: 694-702. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644108>
- Del Valle-Mondragón, L., Tenorio-López, F.A., Torres-Narváez, J.C., Zarco-Olvera, G. and Pastelín-Hernández, G. 2004. Estudio de los extractos de *Magnolia grandiflora* sobre el músculo cardíaco de cobayo. *Archivos de Cardiología de México*. 74(2): 108-117.
- Dominguez-Yescas, R. and Vázquez-García, J.A. 2019. Flower of the heart, *Magnolia yajlachhi* (subsect. Talauma, Magnoliaceae), a new species of ceremonial, medicinal, conservation and nurse tree relevance in the Zapotec culture, Sierra Norte de Oaxaca, Mexico. *Phytotaxa*. 393(1): 21-34. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.393.1.2>
- Elansary, H.O., Szopa, A., Kubica, P., Al-Mana, F.A., Mahmoud, E.A., Zin El-Abedin, T.K.A., Mattarm M.A. and Ekiert, H. 2019. Phenolic compounds of *Catalpa speciosa*, *Taxus cuspidata*, and *Magnolia acuminata* have antioxidant and anticancer activity. *Molecules*. 24(3): 412. <https://doi.org/10.3390/molecules24030412>
- Farag, M.A. and Al-Mahdy, D.A. 2013. Comparative study of the chemical composition and biological activities of *Magnolia grandiflora* and *Magnolia virginiana* flower essential oils. *Natural Product Research*. 27(12): 1091-1097. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.696256>
- Garza, B., Echeverria, A., Gonzalez, F., Castillo, O., Eubanks, T. and Bandyopadhyay, D. 2019. Phytochemical investigation of *Magnolia grandiflora* green seed cones: Analytical and phytochemical studies. *Food Science & Nutrition*. 7(5): 1761-1767. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1016>
- Ho, J.H.C. and Hong, C.Y. 2012. Cardiovascular protection of magnolol: cell-type specificity and dose-related effects. *Journal of Biomedical Science*. 19(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-70>
- Hong, L., Li, G., Zhou, W., Wang, X. and Zhang, K. 2007. Screening and isolation of a nematocidal sesquiterpene from *Magnolia grandiflora* L. *Pest Management Science*. 63(3): 301-305. <https://doi.org/10.1002/ps.1337>
- Huang, H.C., Hsieh, W.Y., Niu, Y.L. and Chang, T.M. 2012. Inhibition of melanogenesis and antioxidant properties of *Magnolia grandiflora* L. flower extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-72>



- Hussein, R.A. and El-Anssary, A.A. 2019. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. En: Herbal Medicine. P. Builders (ed.), pp 11-30. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76139>
- Karpagasundari, C. and Kulothungan, S. 2014. Analysis of bioactive compounds in *Physalis minima* leaves using GC MS, HPLC, UV-VIS and FTIR techniques. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(4): 196-201.
- Kim, B.H. and Cho, J.Y. 2008. Anti-inflammatory effect of honokiol is mediated by PI3K/Akt pathway suppression 1. *Acta Pharmacologica Sinica*. 29(1): 113-122. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00725.x>
- Krishnaraju, A.V., Rao, T.V., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsay, H.S. and Subbaraju, G. V. 2005. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *International Journal of Applied Sciences and Engineering*. 3(2): 125-34. [https://doi.org/10.6703/IJASE.2005.3\(2\).125](https://doi.org/10.6703/IJASE.2005.3(2).125)
- Lan, K.H., Wang, Y.W., Lee, W.P., Lan, K.L., Tseng, S.H., Hung, L.R. and Lee, S.D. 2012. Multiple effects of Honokiol on the life cycle of hepatitis C virus. *Liver International*. 32(6): 989-997. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02621.x>
- Latif, A., Du, Y., Dalal, S.R., Fernández-Murga, M.L., Merino, E.F., Cassera, M.B. and Kingston, D.G. 2017. Bioactive neolignans and other compounds from *Magnolia grandiflora* L.: isolation and antiplasmodial activity. *Chemistry & Biodiversity*. 14(9): e1700209. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700209>
- Lee, Y.J., Lee, Y.M., Lee, C.K., Jung, J.K., Han, S.B. and Hong, J.T. 2011. Therapeutic applications of compounds in the *Magnolia* family. *Pharmacology & Therapeutics*. 130(2): 157-176. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.010>
- Li, Q.Q., Wang, G., Zhang, M., Cuff, C.F., Huang, L. and Reed, E. 2009.  $\beta$ -Elemene, a novel plant-derived antineoplastic agent, increases cisplatin chemosensitivity of lung tumor cells by triggering apoptosis. *Oncology Reports*. 22: 161-170. [https://doi.org/10.3892/or\\_00000420](https://doi.org/10.3892/or_00000420)
- Lim, T.K. 2014. *Magnolia grandiflora*. En: Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. T.K. Lim (ed.). pp. 243-275. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8748-2>
- Ma, H., Bai, X., Sun, X., Li, B., Zhu, M., Dai, Y. and Wu, C.Z. 2020. Anti-cancer effects of methanol-ethyl acetate partitioned fraction from *Magnolia grandiflora* in human non-small cell lung cancer H1975 cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 52(3): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09828-6>
- Martínez-Báez, A.Z., Oranday-Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J., Arévalo-Niño, K., González-González, G.M. and Rodríguez-Garza, R.G. 2016. Estudio preliminar sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 47(2): 36-44.
- Medda, S., Fadda, A., Dessena, L. and Mulas, M. 2021. Quantification of total phenols, tannins, anthocyanins content in *Myrtus communis* L. and antioxidant activity evaluation in function of plant development stages and altitude of origin site. *Agronomy*. 11(6): 1059. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061059>
- Morshedloo, M.R., Quassinti, L., Bramucci, M., Lupidi, G. and Maggi, F. 2017. Chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity on tumour cells of the essential oil from flowers of *Magnolia grandiflora* cultivated in Iran. *Natural Product Research*. 31(24): 2857-2864. <https://doi.org/10.1080/014786419.2017.1303699>
- Niitsuma, T., Morita, S., Hayashi, T., Homma, M. and Oka, K. 2001. Effects of absorbed components of saiboku-to on the release of leukotrienes from polymorphonuclear leukocytes of patients with bronchial asthma. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 23(2): 99. <https://doi.org/10.1358/mf.2001.23.2.627938>
- Njoku, D.I., Chidiebere, M.A., Oguzie, K.L., Oguke, C.E. and Oguzie, E.E. 2013. Corrosion inhibition of mild steel in hydrochloric acid solution by the leaf extract of *Nicotiana tabacum*. *Advances in Materials and Corrosion*. 2(1): 54-61.
- Okerulu, I.O. and Ani, C.J. 2001. The phytochemical analysis and antibacterial screening of extracts of *Tetracarpidium conophorum*. *Journal of Chemical society of Nigeria*. 26(1): 53-55.
- Oliveira, R.N., Mancini, M.C., Oliveira, F.C.S.D., Passos, T.M., Quilty, B., Thiré, R.M.D. S.M. and McGuinness, G.B. 2016. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria*. 21: 767-779. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620160003.0072>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. [Consultado 06 Octubre 2017] 2003. Disponible en: [https://apps.who.int/Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección \(BPAR\) de plantas medicinales/medicinedocs/ Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección \(BPAR\) de plantas medicinalespdf/ Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección \(BPAR\) de plantas medicinales5527s.pdf](https://apps.who.int/Directrices%20de%20la%20OMS%20sobre%20buenas%20pr%C3%A1cticas%20agr%C3%ADcolas%20y%20de%20recoleccion%20(BPAR)%20de%20plantas%20medicinales/medicinedocs/Directrices%20de%20la%20OMS%20sobre%20buenas%20pr%C3%A1cticas%20agr%C3%ADcolas%20y%20de%20recoleccion%20(BPAR)%20de%20plantas%20medicinalespdf/Directrices%20de%20la%20OMS%20sobre%20buenas%20pr%C3%A1cticas%20agr%C3%ADcolas%20y%20de%20recoleccion%20(BPAR)%20de%20plantas%20medicinaless5527s.pdf)
- Pramila, D.M., Xavier, R., Marimuthu, K., Kathiresan, S., Khoo, M.L., Senthilkumar, M. and Sreeramanan, S. 2012. Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (*Mentha piperita*: Lamiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(2): 331-335. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1232>
- Qu, L.L., Jia, Q., Liu, C., Wang, W., Duan, L., Yang, G. and Li, H. 2018. Thin layer chromatography combined with surface-enhanced raman spectroscopy for rapid sensing aflatoxins. *Journal of chromatography*. 1579: 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.024>
- Raut, J.S. and Karuppaiyl, S.M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 62: 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Sánchez-Recillas, A., Mantecón-Reyes, P., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M. and Estrada-Soto, S. 2014. Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7(3): 179-183. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60017-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60017-1)
- Schühly, W., Khan, S.I., Fischer, N.H. 2009. Neolignans from North American *Magnolia* species with cyclooxygenase 2 inhibitory activity. *Inflammopharmacology*. 17(2): 106-110. <https://doi.org/10.1007/s10787-009-7013-y>
- Serna-González, M. and Guzman-Vasquez, J.D. 2010. Una mirada a las magnoliáceas colombianas. *Revista Politécnica*. 6(11): 105-111.

- Sherma, J. and Fried, B. (Eds.). 2003. Handbook of thin-layer chromatography. CRC press. New York, USA.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture. 16(3): 144-158.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A. and Yangsabai, A. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. Medicines. 5(3): 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Yadav, A.R. and Mohite, S.K. 2020. Toxicological Evaluation of *Psidium guajava* leaf extracts using brine shrimp (*Artemia salina* L.) model. Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology. 12(4): 258-260. <https://doi.org/10.5958/0975-4377.2020.00042.7>
- Wang, N., Zhang, C., Bian, S., Chang, P., Xuan, L., Fan, L., Yu, Q., Liu, Z., Gu, C., Zhang, S., Wang, Y. and Shen, Y. 2019. Flavonoid components of different color Magnolia flowers and their relationship to cultivar selections. Hortscience. 54(3): 404-408. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI113462-18>
- Wu, L., Chen, C., Cheng, C., Dai, H., Ai, Y., Lin, C. and Chung, Y. 2018. Evaluation of tyrosinase inhibitory, antioxidant, antimicrobial, and antiaging activities of *Magnolia officinalis* extracts after *Aspergillus niger* fermentation. BioMed Research International. 5201786: 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/5201786>
- Zhang, J., Chen, Z., Huang, X., Shi, W., Zhang, R., Chen, M. and Wu, L. 2019. Insights on the multifunctional activities of magnolol. BioMed Research International. 1847130: 1-15. <https://doi.org/10.1155/2019/1847130>.

# Estimación del riesgo microbiológico asociado al consumo de ostión crudo contaminado con *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*

Microbiological risk assessment associated to raw oyster consumption contaminated with *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*

Karla María López-Hernández, Violeta Trinidad Pardío-Sedas\*, Argel Flores-Primo, David Itzcoatl-Martínez Herrera y Roxana Uscanga-Serrano

Laboratorio de Seguridad Agroalimentaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Av. Miguel Ángel de Quevedo s/n esq. Yáñez, Col. Unidad Veracruzana, C.P. 91710, Veracruz, México

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue predecir el riesgo potencial de exposición a *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* asociado al consumo de ostión americano (*Crassostrea virginica*) crudo colectado del Sistema Lagunar Mandinga (SLM), en restaurantes, coctelerías y puestos ambulantes. El riesgo se estimó como casos esperados/100,000 porciones con el modelo de la FDA. En ostiones del SLM el riesgo estimado por consumir ostiones contaminados con *V. cholerae* noO1/noO139 *ctxA+* sin refrigerar 10 h en verano fue bajo ( $99 \times 10^{-5}$  casos); *V. parahaemolyticus* *tdh+* y *tdh+/trh+* representaron un riesgo estimado alto en primavera ( $2,200 \times 10^{-5}$  y  $4,000 \times 10^{-5}$  casos, respectivamente) y la cepa pandémica *orf8+* un riesgo medio ( $110 \times 10^{-5}$  casos) en invierno. El consumo de ostión crudo sin refrigerar 10 h contaminado con *V. cholerae* noO1/noO139 *ctxA+* representó un riesgo promedio bajo ( $0.87 \times 10^{-5}$  y  $0.44 \times 10^{-5}$  casos) para restaurantes y coctelerías, respectivamente, alto para cocteles expendidos en puestos ambulantes a temperatura ambiente 24 h ( $2,500 \times 10^{-5}$  casos) y bajo a *V. parahaemolyticus* *tdh+* en restaurantes ( $0.21 \times 10^{-5}$  casos) y coctelerías ( $1.1 \times 10^{-5}$  casos). El porcentaje patogénico, el sitio de venta y el tiempo sin refrigerar fueron las variables que incrementaron el riesgo de enfermar, siendo primavera la estación con el mayor riesgo para el consumidor.

**Palabras clave:** Consumo humano, *Crassostrea virginica*, riesgo de salud, cólera, bacterias patógenas

## ABSTRACT

The aim of the study was to assess the potential risk of exposure to *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* associated to raw American oyster (*Crassostrea virginica*) consumption collected from the Mandinga Lagoon System (MLS), in restaurants, oyster bars, and street vendors. Risk was estimated as number of cases/100,000 servings with FDA model. The risk of oyster consumption from MLS contaminated with *V. cholerae* noO1/noO139 *ctxA+* and unrefrigerated 10-h was low ( $99 \times 10^{-5}$  cases) in summer; *V. parahaemolyticus* *tdh+* and *tdh+/trh+* estimated risk was high in spring ( $2,200 \times 10^{-5}$  and  $4,000 \times 10^{-5}$  cases, respectively) and the pandemic strain *orf8+* risk was medium in winter ( $110 \times 10^{-5}$  cases). Oyster cocktail consumption unrefrigerated for 10 h and contaminated with *V. cholerae* noO1/noO139 *ctxA+*, represented a low mean risk ( $0.87 \times 10^{-5}$  and  $0.44 \times 10^{-5}$  cases) for oyster cocktails from

restaurants and oyster bars, respectively, a high mean risk for street vendor cocktails stored at ambient temperature 24-h ( $2,500 \times 10^{-5}$  cases), and a low mean risk for *V. parahaemolyticus* *tdh+* in restaurants ( $0.21 \times 10^{-5}$  cases) and oyster bar ( $1.1 \times 10^{-5}$  cases) cocktails. Risk assessment results indicated that pathogenic percentage, type of establishment, and unrefrigerated storage time were variables that most increased the probability of illness, and spring the season with the highest risk for consumers.

**Key words:** Human consumption, *Crassostrea virginica*, health risk, cholera, pathogenic bacteria.

## INTRODUCCIÓN

Los ostiones pueden bioacumular por filtración bacterias patógenas del agua como *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*, causantes de enfermedades gastrointestinales graves por la presencia de factores toxigénicos (*ctxA* y *ctxA*; *tdh* y *trh*, respectivamente) (Jiang *et al.*, 2018), ocasionadas por el consumo de ostión crudo o mal cocido (Guin *et al.*, 2019; Yoon y Waters, 2019). Actualmente se han registrado más de 200 serogrupos de *V. cholerae* de los cuales, O1/O139 *ctxA+*, son los agentes causales del cólera, enfermedad diarreica infecciosa aguda, epidémica y con alta tasa de mortalidad, mientras que los demás serogrupos han sido tipificados como noO1/noO139 (Boore *et al.*, 2011). Reportes recientes señalan que cepas de *V. cholerae* noO1/noO139 pueden causar diarrea con un incremento de casos de bacteremias y defunciones por septicemia y fascitis necrozante (Zhang *et al.*, 2020). En contraste, la gastroenteritis causada por *V. parahaemolyticus*, aguda o subaguda, ocurre en las primeras 24 h después de la ingestión, acompañada de vómito y diarrea, pudiendo causar shock y muerte especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Guillod *et al.*, 2019). La dosis infectiva de ambos patógenos es de  $> 10^8$  y  $> 10^5$  organismos, respectivamente (Baker-Austin *et al.*, 2018). En México, se confirmaron 339 casos de cólera en diferentes estados de 2015 al 2019 (SSA, 2019). Con respecto a *V. parahaemolyticus*, en 2014 se reportaron 2 casos en el Puerto de Veracruz y en 2015 el 27.7 % de los casos estatales ocurrieron en la zona metropolitana de Veracruz-Boca del Río (SSA, 2016). Diversos estudios señalan que, en regiones costeras, los casos de infecciones por el consumo de mariscos muestran un patrón estacional debido a la influencia de la época



del año en la abundancia y patogenicidad de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* (Pardío, 2007; Baddam *et al.*, 2020; Ndraha y Hsiao, 2021), particularmente en verano y en invierno, reportado en nuestros estudios anteriores (López-Hernández *et al.*, 2015a,b).

Debido al crecimiento dinámico de ambos patógenos en el ostión sin refrigeración (Gooch *et al.*, 2002), la estimación del riesgo es necesaria para asegurar la inocuidad del alimento y la salud del consumidor. La aproximación sistemática para cuantificar el riesgo asociado con la probabilidad de exposición a microorganismos patógenos y su impacto en la salud humana se denomina evaluación del riesgo microbiológico (ERM) y es utilizado para examinar los peligros ocultos en los alimentos, la probabilidad de exposición a éstos y su impacto en la salud pública (Pardío *et al.*, 2016), proporcionando un enfoque para mejorar la seguridad del consumo de mariscos, especialmente crudos. En México, Ortiz-Jiménez (2018) estimó que el riesgo incrementa con el tiempo de postcosecha del ostión, ya que el crecimiento de *V. parahaemolyticus* incrementó hasta las 36 h, por lo que el riesgo fue 5 veces mayor al de las 0 h en ostiones (*Crassostrea corteziensis*) adquiridos en Tepic y cultivados en Boca de Camichín.

*Crassostrea virginica* (ostión americano) se distribuye por las costas del Atlántico de Canadá, Golfo de México, América Central y el Caribe (Betanzos-Vega *et al.*, 2016). En México, la explotación del ostión es una de las actividades pesqueras más importantes, es capturado desde los años 50 logrando mantenerse entre los ocho primeros recursos pesqueros, por su volumen y precio. Este molusco se desarrolla en áreas cercanas a la costa, dentro de la zona intermareal y en los esteros, asociados generalmente a las raíces del mangle o adheridos a sustratos duros como rocas, en fondos someros o directamente sobre el fango y en áreas de influencia estuarina (Mayorga *et al.*, 2021). Actualmente en el país se cultiva ostión americano, ostión de mangle, ostión japonés, ostión de roca, ostión de placer y Kumamoto. Los principales productores de estos moluscos son Veracruz, Tabasco, Baja California Sur y Nayarit (SADR, 2021). El Golfo de México genera el 90 % de la producción nacional ostrícola, compuesta en su mayor parte por ostión americano. *C. virginica* es capturado tradicionalmente en Veracruz, Tabasco, Tamaulipas y Campeche, a nivel de pesquerías artesanales (Mayorga *et al.*, 2021). Sin embargo, proviene principalmente de las granjas de cultivo de Tabasco y Veracruz. Las lagunas costeras del estado de Veracruz representan la mayor parte de la producción ostrícola en México, aportando cerca del 50 % de la producción anual (Hernández-Mendoza *et al.*, 2021).

Por su sabor y valor nutritivo, el consumo de ostión presenta una gran demanda y está disponible para su consumo la mayor parte del año, gracias a la acuicultura. Por lo que, las mejores temporadas para consumirlo van de junio a agosto (verano) y de noviembre a marzo (otoño, invierno, primavera), aunque está disponible para el consumo humano en las cuatro estaciones del año. De acuerdo con su comercialización, el 96.20 % es destinado para consumo humano directo y 1.13 % para indirecto, mientras que el 2.60 % es para

uso industrial (SADR, 2021). En México, el consumo nacional aparente de ostión fue de 20,286.77 ton y un consumo *per cápita* de 0.16 kg (CONAPESCA, 2021), con una producción ostrícola nacional de 53,443 ton, ocupando el estado de Veracruz el primer lugar con 22,798 ton (43 %) (CONAPESCA, 2018). Sin embargo, los estudios de estimación del riesgo asociado al consumo de ostión crudo consumido recién extraído y en los restaurantes son escasos debido a la falta de monitoreo continuo en las áreas de extracción y distribución. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el riesgo microbiológico para estimar el riesgo a enfermar por el consumo de ostión contaminado con *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* colectado de bancos del SLM y cocteles de ostión crudo de venta al público en la zona metropolitana Veracruz-Boca del Río y Mandinga, Veracruz, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### El estudio se realizó en dos fases:

#### Fase 1: Abundancia estacional de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en el ostión cosechado del SLM

Las muestras de ostión (*C. virginica*) se recolectaron en bancos ostrícolas en producción del Sistema Lagunar Mandinga (SLM) (19° 00-06' N, 96° 06' W), localizado a 30 km del Puerto de Veracruz (Figura 1a), en el ciclo anual de enero a diciembre de 2018 durante las cuatro estaciones del año: invierno (enero-marzo), primavera (abril-junio), verano (julio-septiembre) y otoño (octubre-diciembre) debido a la disponibilidad, accesibilidad y preferencias de consumo. Con base al muestreo no probabilístico por cuotas, se recolectaron mensualmente 3 muestras cada una de 40 ostiones de tamaño medio legal (7-8 cm de largo) según lo establecido en la Norma Mexicana NMX-FF-001-SCFI-2011 (NMX-FF-001-SCFI, 2011) y se transportaron inmediatamente en hieleras a 4 °C al laboratorio de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Salud NOM-242-SSA1-2009 (NOM-242-SSA1, 2009). Los ostiones muertos se descartaron y los restantes se lavaron y enjuagaron con agua corriente fría para eliminar lodos, algas, balanos o cualquier otra incrustación y se analizaron en un lapso de 2 h después de su recolección.

#### Fase 2: Densidad de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en el ostión de venta al público

Se recolectaron un total de 36 muestras, 12 en cada tipo de establecimiento (restaurantes, coctelerías y puestos ambulantes) de la zona metropolitana Veracruz-Boca del Río y en la localidad de Mandinga, Veracruz (Figura 1b) en el período de mayo a diciembre de 2019 que correspondió a las épocas con las densidades más altas de ambos patógenos en ostiones cosechados de los bancos del SLM durante la primera fase del estudio. La muestra correspondió a la porción de un coctel de ostión (12 ostiones, 200 g de carne + líquido intravalvar) sin condimentos ni especias. Las muestras colectadas se trasvasaron en bolsas de plástico estériles identificadas que se transportaron en hielera al laboratorio en un lapso  $\leq 2$  h. Los sitios de muestreo se seleccionaron de un censo actualizado de los restaurantes de mariscos, coctelerías y



**Figura 1.** Localización del área de estudio. A. Zona metropolitana Veracruz-Boca del Río, Mandinga y el Sistema Lagunar Mandinga, Veracruz, México. B. Establecimientos minoristas especializados en servir ostiones: restaurantes, coctelerías y puestos ambulantes en los que se consume cocteles de ostión crudo colectado del SLM [Mapa satelital]. (INEGI, 2022).

**Figure 1.** Location of the study area. A. Metropolitan area Veracruz-Boca del Río and Mandinga and Mandinga Lagoon System, Veracruz, México. B. Retail establishments specializing in serving oysters: restaurants, oyster bars, and street vendors where raw oyster cocktails collected from the MLS are consumed [Satellite map]. (INEGI, 2022).

vendedores ambulantes en la zona metropolitana Veracruz-Boca del Río y Mandinga, Veracruz, realizado a partir del registro público de la Dirección de Comercio, Espectáculos y Mercados de los municipios de Veracruz y Boca del Río. La muestra representativa de los sitios de venta de cada zona se estableció con las tablas de Cannon y Roe (1982) mediante un muestreo probabilístico estratificado con asignación proporcional de la muestra.

#### Cuantificación de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*

En las dos fases del estudio, las densidades de *V. cholerae* no-O1/no-O139 y de *V. parahaemolyticus* no patogénicas (*ompW* y *tlh+*, respectivamente) y patogénicas (*ctxA*, *chxA* y *tdh+*, *trh+*, *tdh+/trh+*, *orf8+*, respectivamente) se cuantificaron según la metodología NMP-PCR reportada previamente (López-Hernández et al., 2015a,b). El conteo del número de colonias se realizó a través del método de NMP con la serie de pruebas de tres tubos (95 % de límites de confianza). Los resultados se expresaron como NMP/g (USDA, 2008).

#### Estimación del riesgo

Para la ERM se determinaron inicialmente las preferencias del consumo de ostión en comensales de restaurantes, coctelerías y puestos ambulantes del área metropolitana Veracruz-Boca del Río y Mandinga, Veracruz mediante un muestreo aleatorio simple. El tamaño de la muestra se calculó mediante el método de la FAO a nivel de confiabilidad

de 95 %, una prevalencia estimada de la zoonosis en la zona del 50 % y  $m$  = margen de error de 5 % (FAO, 1990). La ERM promedio por consumo de ostión crudo contaminado con *V. parahaemolyticus* y aplicable a *V. cholerae* se estimó con el modelo de la FDA v.2005 (FDA, 2005) que expresa el riesgo cuantitativo como número de casos esperados/100,000 porciones (cocteles), considerando el consumo de 12 ostiones por persona como tamaño de porción. La predicción del riesgo promedio por porción (IC95 %) se calculó en base a la densidad media normalizada ( $\log_{10}$  NMP/g) de *V. cholerae ompW+* y *V. parahaemolyticus tlh+*, la temperatura media del aire o de refrigeración y el tiempo sin refrigeración del ostión (10 y 24 h), así como el porcentaje patogénico de *V. cholerae ctxA+* y *V. parahaemolyticus tdh+*, *trh+*, *tdh+/trh+* y *orf8+*. Para la estimación del riesgo se contempló el consumo de 12 ostiones por persona como tamaño de porción y el riesgo cuantitativo se expresó como el número de casos esperados/100,000 porciones o cocteles (FDA, 2005). Los resultados del riesgo cuantitativo se clasificaron mediante un sistema de puntuación logarítmica semicuantitativa (FAO/WHO, 2009); de acuerdo con este sistema establecido para la clasificación de la probabilidad, un riesgo alto (puntuación = 2) corresponde a la probabilidad de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ , el riesgo medio (puntuación = 3) de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ , un riesgo bajo (puntuación = 4) de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ , y cuando es riesgo imposible (puntuación = NA) es considerado como 0.

De acuerdo con las prácticas locales de los ostricultores, al término de la extracción los ostiones son clasificados en las instalaciones de las cooperativas y almacenados a temperatura ambiente en costales para su posterior distribución desde las cooperativas hacia los diferentes sitios de venta como centrales de abasto, mercados, restaurantes y coctelerías. Los puestos ambulantes adquieren directamente el producto en las cooperativas, en centrales de abasto o en los mercados de pescadería en el área. Por ello, se estimó un tiempo de 10 h sin refrigeración para la cadena de distribución desde la cosecha y transportación hasta los restaurantes y coctelerías y de 24 h para puestos ambulantes, considerando la distancia desde el SLM hacia los puntos de venta seleccionados. Se consideró una temperatura de refrigeración de 7 °C para el ostión en restaurantes y coctelerías, señalada en la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009 (NOM-242-SSA1, 2009) y una temperatura ambiente promedio de 25.3 °C para los consumidos en puestos ambulantes durante el período de estudio, mientras que para estimar el riesgo por consumir ostiones crudos cosechados del SLM durante el invierno, primavera, verano y otoño, se consideraron las temperaturas ambientales medias de 21.03, 25.56, 25.50 y 21.73 °C, respectivamente (CONAGUA, 2019).

**Análisis estadístico**

Las diferencias significativas entre las densidades medias patogénicas y no patogénicas normalizadas a log<sub>10</sub> NMP/g de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en ostión fresco de la laguna y los cocteles de ostión colectados de los sitios de venta se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía (*p* < 0.05), utilizando el programa estadístico Minitab v.19

(Minitab, Inc., State College PA). Las densidades de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* < 0.30 NMP/g (no detectable) fueron consideradas como 0.15 NMP/g para fines estadísticos. La frecuencia (%) de las respuestas de la encuesta aplicada se calculó con intervalo de confianza del 95 % con el programa en línea VassarStats.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Densidades de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en ostión del SLM y en cocteles de ostión de venta al público**

Los ostiones colectados de los bancos del SLM presentaron densidades medias de *V. cholerae* no-O1/no-O139 no patogénicas (*ompW+*) y patogénicas (*chxA+*) altas (*p* > 0.5) durante el verano y el otoño, mientras que las densidades elevadas (*p* > 0.5) de *V. parahaemolyticus* no patogénicas (*tlh+*) y patogénicas (*tdh+*, *trh+*, *tdh+/trh+*) ocurrieron en primavera, verano y otoño y las de *orf8+* en invierno. En la venta al público, las densidades medias no patogénicas (*ompW+*) y patogénicas (*chxA+*) de *V. cholerae* no-O1/no-O139 en los cocteles de ostión crudo fueron más altas (*p* > 0.5) en los puestos ambulantes (0.69 NMP/g) y en los restaurantes (0.60 NMP/g), mientras que las de *V. parahaemolyticus* *tlh+* fueron altas (22.10 NMP/g) (*p* > 0.5) en restaurantes y las de *V. parahaemolyticus* *tdh+* fueron significativamente (*p* < 0.5) más altas (0.74 NMP/g) en coctelerías (Tabla 1).

Las densidades observadas en el ostión fresco procedente del SLM fueron más bajas que las encontradas en nuestros estudios anteriores en ostión recién cosechado del mismo sistema lagunar, con densidades de *V. cholerae* *ompW+* 1.45 log<sub>10</sub> NMP/g y de *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* 1.18 log<sub>10</sub> NMP/g durante el verano y otoño, respec-

**Tabla 1.** Densidades medias de *V. cholerae* no-O1/no-O139 y *V. parahaemolyticus* no patogénicas (*ompW+* y *tlh+*) y patogénicas (*chxA+*, *tdh+*, *trh+*, *tdh+/trh+* y *orf8+*) en ostión fresco procedente del Sistema Lagunar Mandinga, Veracruz y en ostión crudo a la venta en la zona metropolitana Veracruz-Boca del Río y Mandinga, Veracruz.

**Table 1.** Mean densities of *V. cholerae* no-O1/no-O139 and *V. parahaemolyticus* nonpathogenic (*ompW+* y *tlh+*) and pathogenic (*chxA+*, *tdh+*, *trh+*, *tdh+/trh+* y *orf8+*) in fresh oyster from Manding Lagoon System, Veracruz, and in raw oyster sold in the Metropolitan area Veracruz-Boca del Río and Mandinga, Veracruz.

Época/ Sitios de venta	<i>V. cholerae</i> NMP/g (log <sub>10</sub> NMP/g)		<i>V. parahaemolyticus</i> NMP/g (log <sub>10</sub> NMP/g)				
	<i>ompW+</i>	<i>chxA+</i>	<i>tlh+</i>	<i>tdh+</i>	<i>trh+</i>	<i>tdh+/trh+</i>	<i>orf8+</i>
Sistema Laguna Mandinga							
Invierno	1.13 (0.05)	1.13(0.05)	29.97 (1.48)	15.48 (1.19)	< 0.30 (- 0.82)	< 0.30 (- 0.82)	5.93 (0.77)
Primavera	1.41 (0.15)	< 0.30 (- 0.82)	187.17 (2.27)	27.58 (1.44)	1.32 (0.12)	0.50 (- 0.30)	0.23 (- 0.64)
Verano	2.77 (1.34)	1.15 (0.06)	52.88 (.72)	0.20 (- 0.70)	<0.30 (- 0.82)	< 0.30 (- 0.82)	0.20 (- 0.70)
Otoño	49.38 (1.69)	3.1 (0.49)	38.58 (1.59)	0.27 (- 0.57)	0.40 (- 0.40)	< 0.30 (- 0.82)	< 0.30 (- 0.82)
Zona metropolitana Veracruz-Boca del Río							
Restaurantes	0.60 (- 0.22)	0.60 (- 0.22)	22.10 (1.34)	< 0.30 (- 0.82)	ND	ND	ND
Coctelerías	0.30 (- 0.52)	0.30 (- 0.52)	0.74 (- 0.13)	0.74 (- 0.13)*	ND	ND	ND
Ambulantes	0.69 (- 0.16)	0.69 (- 0.16)	ND	ND	ND	ND	ND

\* Medias estadísticamente diferentes (*p* < 0.05) entre épocas para Sistema Laguna Mandinga y entre sitios de venta para la zona metropolitana Veracruz-Boca del Río; ND: No detectado.



tivamente, el cual representó el primer reporte en ostión del Golfo de México (López-Hernández *et al.*, 2015a), lo que indica que ya son re-emergentes de la zona. Similarmente, las densidades de *V. parahaemolyticus* *tlh+* y *tdh+* del presente estudio también fueron inferiores a las observadas en primavera (3.04 y 2.20 log<sub>10</sub> NMP/g, respectivamente) en el ostión fresco cosechado del SLM (López-Hernández *et al.*, 2015b). En diversas regiones costeras del mundo se ha reportado la influencia de la variación estacional en la densidad total y patogénica de *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus* relacionada con factores ambientales (temperatura, salinidad, clorofila *a*) (Martínez-Urtaza, 2016; Jutla *et al.*, 2011), lo cual podría explicar la estacionalidad de las infecciones, siendo más abundantes en los meses más cálidos.

En el presente estudio se observó que *V. cholerae* no-O1/no-O139 *ompW+* registró altas densidades ( $p > 0.05$ ) en verano y otoño y *V. parahaemolyticus* *tlh+* en primavera y verano. La NOM-242-SSA1-2009 señala que *V. cholerae* O1 y no-O1 deben estar ausentes en 50 g de parte comestible de moluscos bivalvos, pero permite 10<sup>4</sup> NMP/g de *V. parahaemolyticus* sin especificar toxinas. Cabe destacar que la presencia de cepas patogénicas detectadas en los ostiones en el presente estudio representa un riesgo a la salud para las personas sanas, pero principalmente para las inmunocomprometidas o con padecimientos crónico-degenerativos (diabetes, cirrosis, hipertensión) por el riesgo a contraer gastroenteritis grave o desarrollar septicemia. La edad, los problemas hepáticos y la inmunocompetencia, son los tres principales factores de riesgo de *V. parahaemolyticus* (Jiang *et al.*, 2018; Suresh *et al.*, 2019). La toxina termoestable directa (TDH), codificada por el gen *tdh* de *V. parahaemolyticus* es considerada, con la hemolisina TDH-relacionada (TRH), los factores de virulencia más importantes de este patógeno que presentan varias actividades biológicas, como hemolítica, enterotoxicidad, citotoxicidad y cardiotoxicidad (Jiang *et al.*, 2018). La abundancia del gen *chxA* encontrado en este estudio (100 % en invierno) es significativo, ya que codifica a la toxina Cholix A (ChxA), un factor de virulencia identificado principalmente en cepas no pandémicas, necesario para la virulencia del patógeno en la colonización, señalización bacteria-animal y supervivencia en el medio acuático (Jørgense *et al.*, 2008). Esta potente citotoxina con actividad específica ADP-ribosiltransferasa produce muerte celular y apoptosis en las células HeLa. Se ha reportado que *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* desarrolló septicemia, coagulación intravascular y fallo orgánico múltiple en un paciente infectado (Awasthi *et al.*, 2013).

En este contexto, es importante señalar que la variación en el número de cepas patogénicas de *V. cholerae* no-O1/no-O139 y *V. parahaemolyticus* en el ostión debería determinarse antes de la cosecha debido a que representan un riesgo para la salud humana, especialmente porque no están contempladas en la regulación actual, por lo que la significancia epidemiológica de estos patógenos pudiera estar subestimada. De ahí la importancia de evaluar la relación *Vibrio* spp. -ambiente-ostión-salud para asegurar la inocuidad del alimento y reducir el riesgo a la salud por consumo del ostión.

## Estimación del riesgo

### Perfil del consumidor y preferencias de consumo

El análisis de las encuestas (403) indicó que la preferencia del consumo de ostión fue similar en las tres zonas de estudio: Veracruz 35.37 %, Boca del Río 35.37 % y Mandinga 29.27 %. El 94.39 % del ostión de venta en los restaurantes, coctelerías y puestos ambulantes muestreados procede del SLM. La mayor frecuencia de consumo de cocteles (12 ostiones) es de 1 a 2 veces al mes (88.78 %), en crudo (95.37 %) y principalmente durante primavera (37.56 %) y verano (56.83 %). El 21 % de los consumidores señaló haber contraído hepatitis o padecer de hipertensión y diabetes.

### Estimación del riesgo por consumo de ostión crudo del SLM

El riesgo promedio por consumir ostión crudo del SLM sin refrigerar 10 h y contaminado con *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* se estimó de 99 casos/100,000 porciones en verano, 1.5-6.6 veces mayor al calculado para las otras estaciones. Sin embargo, el riesgo promedio es clasificado como bajo. En contraste, el riesgo en ostiones con 24 h sin refrigeración durante el verano fue 42.4 veces mayor al calculado con 10 h sin refrigeración. No obstante, el riesgo por consumir ostiones con 24 h sin refrigeración en las estaciones de invierno, primavera y otoño se consideraría medio, mientras que en verano sería alto, ya que se esperarían 4.2 casos/100 porciones o cocteles de ostión consumidos. Respecto a *V. parahaemolyticus* (Tabla 3), el riesgo de enfermar por el consumo de ostión crudo sin refrigerar 10 h, fue alto en primavera para *tdh+* y para *tdh+/trh+* (4 casos/100 porciones), comparados al riesgo medio para *orf8+* ( $1.1 \times 10^{-3}$  casos) en invierno. Similarmente, el riesgo promedio por consumir ostiones contaminados con *V. parahaemolyticus* *tdh+*, *trh+* y *tdh+/trh+* con 24 h sin refrigeración fue mayor en primavera, representando un riesgo alto con un estimado de 4 a 9 casos/100 porciones y para la cepa pandémica (*orf8+*) en invierno con 1 caso/100 porciones, riesgo 10 veces mayor al calculado con 10 h sin refrigeración en ambos casos (Tabla 2).

El riesgo promedio estimado por porción de 12 ostiones asociado con el consumo de ostión fresco del SLM con 10 horas sin refrigeración y contaminado con *V. parahaemolyticus* *tdh+* ( $2.20 \times 10^{-2}$  casos) fue mayor al reportado en ostiones recién cosechados procedentes de la Costa del Golfo (Louisiana) ( $2.10 \times 10^{-6}$ ) en invierno por la FDA (2005), al de Brasil ( $3.6 \times 10^{-3}$ ) (Costa *et al.*, 2014) y del Golfo de México en primavera ( $1.45 \times 10^{-4}$ ) (WHO/FAO, 2011). Asimismo, fue mayor al reciente estudio de Cooksey (2021) que estimó el riesgo a enfermar por *V. parahaemolyticus* por el consumo de ostiones colectados por recreación en California, E.U.A. mediante un modelo de estimación del riesgo cuantitativo por la vía pre- y post- "del mar a la mesa", obteniendo un riesgo medio a enfermar por ración de ostiones recién cosechados contaminados con *V. parahaemolyticus* de  $5.61 \times 10^{-5}$ . El análisis resaltó el impacto en el riesgo de la concentración inicial de *V. parahaemolyticus* en los ostiones, el número de ostiones consumidos y la concentración de *V. parahaemolyti-*

**Tabla 3.** Predicción del Riesgo promedio ( $IC_{95\%}$ ) asociado con el consumo de ostión fresco del Sistema Lagunar Mandinga, Veracruz contaminado con *V. parahaemolyticus* *tdh+*, *tdh+/trh+* y *orf8+*.

**Table 3.** Average risk assessment ( $IC_{95\%}$ ) associated with consumption of fresh oyster from Mandinga Lagoon System, Veracruz, contaminated with *V. parahaemolyticus* *tdh+*, *tdh+/trh+* y *orf8+*.

Época	Media log NMP/g	Casos esperados por c/100.000 porciones* ( $IC_{95\%}$ )			
		<i>tdh+</i>	<i>trh+</i>	<i>tdh+/trh+</i>	<i>orf8+</i>
Riesgo calculado para ostiones con 10 h sin refrigeración					
Invierno	1.48	280 (22 - 3,500)	0.96 (0.076 - 12)	0.96 (0.076 - 12)	110 (8.4 - 130)
Primavera	2.27	2,200 (180 - 28,000)	110 (8.5 - 1,300)	4,000 (320 - 51,000)	18 (1.5 - 230)
Verano	1.72	7.9 (0.24 - 38)	7.9 (0.62 - 99)	7.9 (0.62 - 99)	16 (1.3 - 200)
Otoño	1.59	5.9 (0.47 - 74)	8.8 (0.7 - 110)	1.5 (0.12 - 19)	1.5 (0.12 - 19)
Riesgo calculado para ostiones con 24 h sin refrigeración					
Invierno	1.48	2,800 (220 - 35,000)	9.8 (0.77 - 120)	9.8 (0.77 - 120)	1,100 (84 - 13,000)
Primavera	2.27	8,600 (690 - 110,000)	4,600 (370 - 59,000)	9,100 (730 - 120,000)	790 (64 - 10,000)
Verano	1.72	330 (10 - 1,600)	330 (26 - 4,200)	330 (26 - 4,200)	690 (54 - 8,600)
Otoño	1.59	74 (5.8 - 920)	110 (8.7 - 1,400)	19 (1.5 - 240)	19 (1.5 - 240)

\* Porción: 12 ostiones (200 g de carne + líquido intravalvar).

**Tabla 2.** Predicción del Riesgo promedio ( $IC_{95\%}$ ) asociado con el consumo de ostión fresco del Sistema Lagunar Mandinga, Veracruz, contaminado con *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+*.

**Table 2.** Average risk assessment ( $IC_{95\%}$ ) associated with consumption of fresh oyster from Mandinga Lagoon System, Veracruz, contaminated with *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+*.

Época	Media log NMP/g	Casos esperados por c/100.000 porciones* ( $IC_{95\%}$ )	
		Ostiones con 10 h sin refrigeración	Ostiones con 24 h sin refrigeración
Invierno	0.05	22 (1.7 - 270)	220 (17 - 2,700)
Primavera	0.15	15 (1.2 - 190)	630 (52 - 8,200)
Verano	1.34	99 (7.9 - 1,200)	4,200 (330 - 53,000)
Otoño	1.69	67 (5.3 - 840)	850 (66 - 10,000)

\* Porción: 12 ostiones (200 g de carne + líquido intravalvar).

*cus* patogénicos, comparable a lo encontrado en el presente estudio. El modelo de la FDA establece como riesgo aceptable estándar un caso/100,000 porciones ( $1 \times 10^{-5}$ ). Se observa en el Golfo de México un riesgo promedio bajo, pero alto para las costas de Veracruz, México, probablemente debido a la diferencia del porcentaje patogénico y las condiciones ambientales locales.

Ndraha y Hsiao (2019) estimaron el riesgo por *V. parahaemolyticus* asociado con el consumo de ostión crudo en Taiwán y encontraron que el riesgo en verano era 0.5, 1.0 y 3.1 veces mayor que en otoño, primavera e invierno, respectivamente. Lo anterior difiere a lo observado en el presente estudio, ya que el riesgo por consumo de ostión fresco de la laguna durante la primavera fue 278.48 veces mayor que en verano (Tabla 3). Estos resultados son comparables a los encontrados por Jong-Kyung *et al.* (2018) quienes estimaron un riesgo promedio de enfermar por consumo de una ración

de ostión crudo recién extraído y contaminado con *V. parahaemolyticus* de  $5.71 \times 10^{-5}$  durante los meses de primavera. Los principales factores que influyeron en el riesgo estimado fueron la concentración inicial de *V. parahaemolyticus* (log NPM/g), la cantidad de ostiones consumidos, prevalencia de las cepas patogénicas, la temperatura y el tiempo de exposición.

### Estimación del riesgo por consumo de cocteles de ostión crudo de venta al público

El riesgo promedio asociado con el consumo de cocteles de ostión crudo con 10 h sin refrigeración de venta en restaurantes y coctelerías contaminado con *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* fue menor a 1 caso/100,000 porciones; sin embargo, el riesgo por consumir cocteles en puestos ambulantes sería alto (2.5 casos/100 cocteles). De igual forma, el consumo de 24 ostiones por porción representaría un riesgo alto ( $8.20 \times 10^{-2}$ ). Cabe mencionar que si bien el 100 % de las muestras presentó *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* en los tres sitios de venta (100 % de porcentaje patogénico), el riesgo promedio sería mayor para las personas que consumen en puestos ambulantes debido a la temperatura ambiente promedio considerada en el modelo. *V. parahaemolyticus* *tdh+* se detectó en los cocteles de venta en restaurantes y coctelerías con un porcentaje patogénico de 0.68 y 100 %, respectivamente, estimándose un riesgo promedio de 0.21 y  $1.10 \times 10^{-5}$  casos con 12 ostiones por porción, respectivamente y de 0.43 y  $2.10 \times 10^{-5}$ , respectivamente, con una porción de 24 ostiones, representando ambos un riesgo bajo. *V. parahaemolyticus* no se detectó en ostiones de puestos ambulantes, considerado como riesgo imposible (Tabla 4).

El riesgo estimado en el presente estudio fue mayor al reportado por Ding *et al.* (2022), cuyos resultados mostraron que el riesgo a enfermar por persona por año causado por

**Tabla 4.** Predicción del Riesgo promedio por porción ( $IC_{95\%}$ ) asociado con el consumo de *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* y *V. parahaemolyticus* *tdh+* en ostión crudo vendido en restaurantes, coctelerías y vendedores ambulantes en la zona metropolitana Veracruz-Boca del Río y Mandinga, Veracruz.

**Table 4.** Average risk assessment ( $IC_{95\%}$ ) associated with consumption of *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* y *V. parahaemolyticus* *tdh+* in raw oyster sold in restaurants, cocktail bars, and street vendors in the Metropolitan area Veracruz-Boca del Río and Mandinga, Veracruz.

Vibrio en ostión/ sitios de venta	Media del $\log_{10}$ (NMP/g)	% Patogénico	Temperatura de refrigeración (°C)	Tiempo máximo sin refrigerar (h)	Casos esperados por c/100,000 porciones * ( $IC_{95\%}$ )	Casos esperados por c/100,000 porciones** ( $IC_{95\%}$ )
<i>V. cholerae</i> ( <i>chxA+</i> )						
Restaurantes	- 0.22	100.00	7.0	10	0.87 (0.069 - 11)	1.70 (0.13 - 21)
Coctelerías	- 0.52	100.00	7.0	10	0.44 (0.035 - 5.5)	0.87 (0.069 - 11)
Ambulantes	- 0.16	100.00	25.3	24	2,500.00 (200 - 31,000)	8,200.00 (650 - 100,000)
<i>V. parahaemolyticus</i> ( <i>tdh+</i> )						
Restaurantes	1.34	0.68	7.0	10	0.21 (0.017 - 2.7)	0.43 (0.034 - 5.4)
Coctelerías	- 0.13	100.00	7.0	10	1.10 (0.085 - 13)	2.10 (0.17 - 27)
Ambulantes	ND	ND	7.0	24	ND	ND

ND: No detectado; \* Porción: 12 ostiones (200 g de carne + líquido intravalvar); \*\* Porción: 24 ostiones (400 g de carne + líquido intravalvar).

*V. parahaemolyticus* debido al consumo de mariscos crudos comprados y cocidos en casa en una ciudad costera del este de China era de  $3.49 \times 10^{-5}$ . Cabe señalar que observaron diferencias estacionales ya que el máximo riesgo ocurrió en verano ( $4.81 \times 10^{-6}$ ) y el mínimo en invierno ( $2.27 \times 10^{-7}$ ), mientras que en el presente estudio el máximo riesgo se presentó en primavera ( $2.20 \times 10^{-2}$ ) y en invierno ( $2.80 \times 10^{-3}$ ). Costa *et al.* (2014), reportaron que la densidad de *V. parahaemolyticus* en ostiones crudos es mayor en el punto de consumo que en el de cosecha, lo cual difiere de lo reportado en el presente estudio, ya que las densidades de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en los ostiones de venta al público fueron menores a las observadas en los ostiones frescos de la laguna, excepto para *V. parahaemolyticus* *tlh+* (22.10 NMP/g), estos valores pudieran deberse al efecto de la temperatura de refrigeración en los restaurantes y coctelerías como reporta Gooch *et al.* (2002). Sin embargo, en verano, el riesgo promedio por porción por consumir ostión fresco del SLM contaminado con *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* (10 h sin refrigeración) sería bajo ( $9.9 \times 10^{-4}$ ), pero alto en puestos ambulantes ( $2.5 \times 10^{-2}$ ), posiblemente debido al porcentaje patogénico (5.28 y 100 %, respectivamente) y a la temperatura ambiente promedio de distribución y conservación del ostión durante el estudio. En contraste, en el caso de *V. parahaemolyticus* *tdh+*, se presentaría un riesgo alto en primavera ( $2.2 \times 10^{-2}$ ) por consumir ostiones crudos frescos del SLM, mientras que el riesgo sería bajo por consumir ostiones crudos en las coctelerías ( $1.1 \times 10^{-5}$ ) a pesar de los porcentajes patogénicos de 14.74 y 100 %, respectivamente. No se encontró en la literatura consultada evaluaciones de riesgo del consumo de cocteles de ostión en sitios de venta para *V. cholerae* no-O1/no-O139 *chxA+* y *V. parahaemolyticus* *tdh+*.

Desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria, la presencia de cepas de *V. cholerae* no-O1/no-O139 y *V. parahaemolyticus* con genes patogénicos plantea importantes

problemas de salud. Nuestros resultados son preocupantes debido a que el porcentaje patogénico en otras áreas ambientales raramente excede el 3 % (Rehnstam-Holm *et al.*, 2014). Es importante señalar que la predicción del riesgo a la salud asociado al consumo de ostión crudo contaminado con cepas patogénicas es de naturaleza dinámica por estar influenciado por diversas variables, entre ellas el origen de la muestra, las densidades, el porcentaje de cepas patogénicas, el consumo y el consumidor (Dickinson *et al.*, 2013; Love *et al.*, 2020). Asimismo, puede diferir con el método de producción y las prácticas de manejo de los productores. De ahí la importancia de estimar el riesgo a la salud para identificar las posibles intervenciones y reducir o eliminar el riesgo (Pardío *et al.*, 2016). En este sentido, anualmente se consumen aproximadamente 22,162 t de ostión crudo en el estado de Veracruz, con un consumo *per cápita* de 0.43 kg (CONAPESCA, 2018). El SLM es una de las lagunas estuarinas costeras económicamente importante por la mayor producción de ostión, consumo y recreación. El problema más grave que presenta es la cantidad de descargas de drenaje provenientes de los asentamientos humanos a su alrededor, el incremento en la densidad de la población y la creciente actividad turística (Lara-Domínguez *et al.*, 2009). Los ostiones del SLM se distribuyen a hoteles, restaurantes, coctelerías y mercados en la zona Metropolitana Veracruz – Boca del Río y enviados a Cancún, Monterrey y la Ciudad de México al Mercado de la Viga. De acuerdo a la encuesta, el 95.37 % de los consumidores acostumbra a consumir un coctel de ostiones 1 a 2 veces al mes (88.78 %), principalmente en primavera y verano, que correspondieron a los meses donde se estimó un mayor riesgo. Si el consumir  $\geq 2$  cocteles al mes es considerado un riesgo (Jutla *et al.*, 2011), el riesgo a enfermar de la población es alto.

Cabe mencionar que la mayor frecuencia de consumo se encontró en hombres (65.1 %), cercano al 73.6 % encontra-



do en Trinidad y Tobago (Laloo *et al.*, 2000). Desde la perspectiva de salud pública, el consumo de estos ostiones debería ser considerado como un peligro potencial a la salud. En México y varios países de Latinoamérica, la diarrea aguda de etiología infecciosa, fundamentalmente de origen por exposición a alimentos y agua contaminados, es un problema de salud pública debido a las altas tasas reportadas anualmente de morbilidad y mortalidad. En México, *Vibrio* spp. (1 %) se ha aislado en materia fecal de pacientes ambulatorios (614 muestras), niños, adolescentes y adultos, con diarrea aguda en Veracruz, Villahermosa, Mérida y Tuxtla Gutiérrez. Se ha asociado con factores como condiciones climáticas y socioeconómicas, así como el entorno sanitario, especialmente para la población vulnerable (Novoa-Farias *et al.*, 2017).

No se encontraron reportes de evaluaciones del riesgo en sitios de venta ya que la mayoría de las investigaciones reportadas tienen un enfoque sanitario y epidemiológico, lo que destaca la importancia y aporte del presente estudio que sería el primer reporte en México. Los hallazgos de esta investigación representan un punto de referencia para aplicar las medidas de control apropiadas y/o reglamentarias tales como la vigilancia de la cadena fría y la normalización de los procesos de desinfección avanzada del ostión después de su extracción. Si las medidas para mitigar estos patógenos no conducen a la reducción del riesgo y el escenario del cambio climático empeora, las predicciones del riesgo a enfermar podrían incrementarse. En consecuencia, es necesario que el consumidor sea concientizado de que una enfermedad de origen alimentario no debe ser considerada como una enfermedad menor debido a la presencia de patógenos en el alimento.

## CONCLUSIONES

La presencia de cepas patogénicas de *V. cholerae* no-O1/no-O139 y de *V. parahaemolyticus* en el ostión fresco colectado del SLM se observa principalmente en verano y primavera, así como en cocteles expendidos en sitios de venta de la zona Metropolitana Veracruz – Boca del Río. Consumir un coctel de ostión crudo sin refrigerar (10 h) contaminado con *V. cholerae* no-O1/no-O139 *ctxA+* y *V. parahaemolyticus* *tdh+* en puestos ambulantes y en coctelerías, respectivamente, representa un riesgo mayor.

Las estimaciones del riesgo de consumir ostiones crudos recién cosechados indican que el porcentaje patogénico, el sitio de venta, la época estacional, el tiempo que permanece el ostión sin refrigerar y la temperatura en el almacenamiento postcosecha, influyen en la probabilidad de enfermar. Los valores del riesgo estimado sugieren que el riesgo a enfermar por consumo de ostión contaminado con ambos patógenos estuvo por arriba de la referencia establecida por la FDA. Los hallazgos obtenidos en esta investigación representan un punto de referencia para aplicar medidas de control apropiadas y/o reglamentarias tales como la vigilancia de la cadena fría y la normalización de los procesos de desinfección avanzada del ostión después de su extracción que permitirá prevenir brotes de enfermedades de origen

alimentario. Si las medidas para mitigar estos patógenos no conducen a la reducción del riesgo y el escenario del cambio climático empeora, las predicciones del riesgo a enfermar podrían incrementarse. Por lo anterior, se puede considerar a este alimento como inadecuado para el consumo de la población debido al riesgo potencial a la salud que representan ambos patógenos, por lo que es necesario informar al consumidor a fin de que considere modificar su preferencia de consumo hacia alimentos más seguros.

## REFERENCIAS

- Awasthi, S., Asakura, M., Chowdhury, N., Neogi, S.B., Hinenoya, A., Golbar, H.M., Yamate, J., Arakawa, E., Tada, T. y Yamasaki, S. 2013. Novel Cholera toxin variants, ASP-ribosylating toxins in *Vibrio cholerae* non-O1/non-139 strains, and their pathogenicity. *Infection Immunology*. 81(2): 531-541. <https://doi.org/10.1128/IAI.00982-12>
- Baddam, R., Sarker, N., Ahmed, D., Mazumder, R., Abdullah, A., Morshed, R., Hussain, A., Begum, S., Shahrin, L., Khan, A., Islam, S., Ahmed, T., Alam, M., Clemens, J. y Ahmed, N. 2020. Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 11(1): e3339-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03339-19>
- Baker-Austin, C., Oliver, J., Alam, M., Ali, A., Waldor, M., Qadri, F. y Martínez-Urtaza, J. 2018. *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*. 4(1): 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Boore, A., Iwamoto, M., Mintz, E., Yu, P. y Chaignat, C. 2011. Cólera y otras enfermedades causadas por vibriones. En: El control de las enfermedades transmisibles. D.L. Heymann (ed.), pp 77-91. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Betanzos-Vega, A., Lodeiros, C., Espinosa-Sáez, J. y Mazón-Suástegui, J.M. 2016. Identificación del ostión americano *Crassostrea virginica* (Mollusca: Bivalvia: Ostreidae) como recurso natural en las Antillas Mayores: Cuba. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87(4): 1342-1347. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1176/1/PUB-ARTICULO-3490.PDF>
- Cannon, R.M. y Roe, R.T. 1982. *Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians*. Government Publishing Service. Canberra, Australia.
- Comisión Nacional del Agua. Resúmenes mensuales de temperaturas y lluvias. [Consultado 6 diciembre 2021] 2019. Disponible en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias>
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. [Consultado 6 diciembre 2021] 2018. Disponible en: <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca>
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Dirección General de Planeación, Programación y Evaluación. [Consultado 3 enero 2022] 2021. Disponible en: [http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi\\_apps/WFServlet?IBIF\\_ex=D2\\_PESCA03\\_02&IBIC\\_user=dgeia\\_mce&IBIC\\_pass=dgeia\\_mce&NOMBREANIO=\\*](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D2_PESCA03_02&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce&NOMBREANIO=*)
- Cooksey, E. 2021. The world is your oyster: A multidisciplinary approach to evaluate the spatial distribution, occurrence, and risk of *V. parahaemolyticus* in oysters and water. Tesis Doctoral. The University of Arizona, Tucson.

- Costa, S., P. del S., Destro, M.T., Franco, B.D.G.M. y Landgraf, M. 2014. A quantitative risk assessment model for *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 180: 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.008>
- Dickinson, G., Lim, K. y Jiang, S.C 2013. Quantitative microbial risk assessment of pathogenic *Vibrios* in marine recreational waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(1): 294-302. <https://doi.org/10.1128/AEM.02674-12>
- Ding, G., Zhao, L., Xu, J., Cheng, J., Cai, Y., Du, H., Xiao, G., y Zhao, F. 2022. Quantitative risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from retail to consumption in coastal city of East China. *Journal of Food Protection*. 85(9): 1320-1328. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-238>
- FAO. 1990. Conducting small-scale nutrition surveys: A field manual. *Nutrition in Agriculture No. 5. Policy and Nutrition Division*. Rome, Italy.
- FAO/WHO. 2009. Risk Characterization of Microbiological Hazards in Food: Guidelines. *Microbiological Risk Assessment Series 17*. Rome, Italy.
- FDA. 2005. Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Department of Health and Human Services, College Park, Maryland, United States.
- Guillod, C., Ghitti, F. y Mainett, C. 2019. *Vibrio parahaemolyticus* induced cellulitis and septic shock after a sea beach holiday in a patient with leg ulcers. *Case Reports in Dermatology*. 11(1): 94-100. <https://doi.org/10.1159/000499478>
- Guin, S., Saravanan, M., Chowdhury, G., Pazhani, G., Ramamurthy, T. y Das, S. 2019. Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in diarrhoeal patients, fish and aquatic environments and their potential for inter-source transmission. *Heliyon*. 5(5): e01743. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01743>
- Gooch, J.A., DePaola, A., Bower, J. y Marshall, D.L. 2002. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oyster. *Journal of Food Protection*. 65(6): 970-974. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.6.970>
- Hernández-Mendoza, D.M., San Martín-del Ángel, P., Jiménez-Torres, C. y Hernández-Herrera, R.I. 2021. Monitoreo de *Vibrio* spp. en ostiones *Crassostrea virginica* de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz, México. *Biológico Agropecuario Tuxpan*. 9(1): 122-141. <https://doi.org/10.47808/revistabiogro.v9i1.346>
- Instituto Nacional de Estadística Geografía. Espacio y Datos de México. [Consultado 7 abril 2022] 2022. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/espaciodydatos/default.aspx?ag=18>
- Jiang, F., Bi, R., Deng, L., Kang, H., Gu, B. y Ma, P. 2018. Virulence-associated genes and molecular characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hepatitis B cirrhosis patients in China. *International Journal of Infectious Diseases*. 74: 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.06.021>
- Jong-Kyung, L., Ki-Sun, Y., Hyang, L. y Hyun-Jung, K. 2018. A risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* for consumption of shucked raw oyster in Korea. *Journal of Food Hygiene and Safety* 33(4): 48-254. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.4.248>
- Jørgense, R., Purdy, A.E., Fieldhouse, R.J., Kimber, M.S., Bartlett, D.H. y Merrill, A.R. 2008. Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*. 283(16): 10671-10678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710008200>
- Jutla, A.S., Akanda, A.S., Griffiths, J.K., Colwell, R. y Islam, S. 2011. Warming oceans, phytoplankton, and river discharge: Implications for cholera outbreaks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 85(2): 303-308. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0181>
- Laloo, S., Rampersad, F.S., La Borde, A., Maharaj, K., Sookhai, L., Teelucksingh, J.D., Reid, S., McDougll, L. y Adesiyun A.A. 2000. Bacteriological quality of raw oysters in Trinidad and the attitudes, knowledge and perceptions of the public about its consumption. *International Journal of Food Microbiology*. 54(1-2): 99-107. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00161-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00161-0)
- Lara-Domínguez, A.L., López-Portillo, J., Martínez-González, R. y Vázquez-Lule, A.D. 2009. Sitios de manglar con relevancia biológica y con necesidades de rehabilitación ecológica: Caracterización del sitio de manglar Mandinga. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D.F.
- Love, D.C., Kuehl, L.M., Lane, R.M., Fry, J.P., Harding, J., Davis, B.J.K., Clancy, K. y Hudson, B. 2020. Performance of cold chains and modeled growth of *Vibrio parahaemolyticus* for farmed oysters distributed in the United States and internationally. *International Journal of Food Microbiology*. 313: 108378. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108378>
- López-Hernández, K.M., Pardío-Sedas, V., Lizárraga-Partida, L., Williams, J.J., Martínez-Herrera, D., Flores-Primo, A. y Uscanga-Serrano, R. 2015a. Seasonal abundance of *Vibrio cholerae* non O1/O139 in oysters harvested in a coastal lagoon of Mexico's Gulf coast. *Food Control*. 53: 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.004>
- López-Hernández, K.M., Pardío-Sedas, V.T., Lizárraga-Partida, L., Williams, J.J., Martínez-Herrera, D., Flores-Primo, A., Uscanga-Serrano, R. y Rendón-Castro, K. 2015b. Environmental parameters influence on the dynamics of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in *Crassostrea virginica* harvested from Mexico's Gulf coast. *Marine Pollution Bulletin*. 91(1): 317-329. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.015>
- Martinez-Urtaza, J., Powell, A., Jansa, J., Castro, R.J.L., Paz, M.O., García, C.M., Zamora, López M.J., Pousa, A., Faraldo, V.M.J., Trinanes, J., Hervio-Heath, D., Keay, W., Bayley, A., Hartnell, R. y Baker-Austin, C. 2016. Epidemiological investigation of a foodborne outbreak in Spain associated with U.S. West Coast genotypes of *Vibrio parahaemolyticus*. *SpringerPlus*. 5: 87. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1728-1>
- Mayorga, C.J.C., Brito-Manzano, N.P., Vargas-Falcón, P.M. y Perera, G.M.A. 2021. Aspectos de la dinámica poblacional del ostión del ostión *Crassostrea virginica* en tres lagunas costeras de Tabasco, México. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*. 4(4): 6003-6011. <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n4-093>
- Ndraha, N. y Hsiao, H. 2019. The risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters in Taiwan under the seasonal variations, time horizons, and climate scenarios. *Food Control*. 102: 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.020>
- Ndraha, N. y Hsiao H. 2021. Influence of climatic factors on the temporal occurrence and distribution of total and

- pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster culture environments in Taiwan. *Food Microbiology* 98: 103765. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103765>
- Novoa-Farías, O., Frati-Murani, A.C., Peredo, M.A., Flores-Juárez, S., Novoa-García, O., Galicia-Tapia, J. y Romero-Carpio, C.E. 2017. Susceptibilidad a la rifaximina y otros antimicrobianos de bacterias aisladas en pacientes con infecciones gastrointestinales agudas en el sureste de México. *Revista de Gastroenterología de México*. 82(3): 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.10.006>
- Ortiz-Jiménez, M.A. 2018. Quantitative evaluation of the risk of *Vibrio parahaemolyticus* through consumption of raw oysters (*Crassostrea corteziensis*) in Tepic, Mexico, under the RCP2.6 and RCP8.5 climate scenarios at different time horizons. *Food Research International*. 111: 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.012>
- Pardío, S.V.T. 2007. Influence of environmental factors on the presence of *Vibrio cholerae* in the marine environment: a climate link. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 1(3): 224-241. <https://doi.org/10.3855/jidc.359>
- Pardío, S.V.T., López, H.K.M. y Flores, P.A. 2016. Quantitative Risk Assessment in Seafood. En: *Handbook of Seafood: Quality and Safety Maintenance and Applications*. I. Yüksel, E. Esteves y A. Diler (ed.), pp 209-222. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, USA.
- Norma Oficial Mexicana NMX-FF-001-SCFI-2011 Productos de la pesca - ostión en concha vivo, y pulpa envasada - refrigerada (Litoral Atlántico) – Especificaciones. [Consultado 4 diciembre 2021] 2011. Disponible en: <http://www.economia.gob.mx/>
- Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. [Consultado 4 diciembre 2021] 2009. Disponible en: <http://portal.salud.gob.mx>
- Rehnstam-Holm, A., Atnur, V., y Godhe, A. 2014. Defining the niche of *Vibrio parahaemolyticus* during pre- and post-monsoon seasons in the coastal Arabian Sea. *Microbial Ecology*. 67(1): 57-65. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0311-3>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ostras y ostiones, fuente de vitaminas y minerales que está disponible para su consumo la mayor parte del año. [Consultado 16 agosto 2022] 2021. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/>
- Secretaría de Salud. Listado nominal de resultados. Veracruz, México. [Consultado 4 diciembre 2021] 2016. Disponible en: <https://www.gob.mx/>
- Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. [Consultado 4 diciembre 2021] 2019. Disponible en: <https://www.gob.mx>
- Suresh, S., Karanth, P.A., Prabbakara, A.P., Akash, S.K., Maiti, B., Karunasagar, I., Karunasagar, I. y Premanath, R. 2019. Diabetic foot ulcer caused by *Vibrio parahaemolyticus*: Two case reports. *Clinical Microbiology Newsletter*. 41(11): 101-102. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2019.01.002>
- United States Department of Agriculture. Laboratory Quality Assurance Division (LQAD). Most Probable Number Procedure and Tables. MLG Appendix 2.03. [Consultado 25 septiembre 2021] 2008. Disponible en: [http://www.foodriskhub.com/images/wbans\\_1268803319/MLG\\_Appendix\\_2\\_03.pdf](http://www.foodriskhub.com/images/wbans_1268803319/MLG_Appendix_2_03.pdf)
- WHO/FAO. 2011. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Interpretative summary and technical report. Rome, Italy.
- Yoon, S.H. y Waters, C.M. 2019. *Vibrio cholerae*. *Trends in Microbiology*. 27(9): 806-807. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.005>
- Zhang, X., Lu, Y., Qian, H., Liu, G., Mei, Y., Jin, F., Xia, W. y Ni, F. 2020. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* (NOVC) bacteremia: case report and literature review, 2015-2019. *Infection and Drug Resistance*. 13: 1009-1016. <https://doi.org/10.2147/IDR.S245806>



# Antagonismo de cepas de *Trichoderma* aisladas en Tanaxuri, Michoacán, México contra patógenos postcosecha del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill)

Antagonism of *Trichoderma* strains isolated from Tanaxuri, Michoacan, Mexico against postharvest pathogens of avocado fruits (*Persea americana* Mill)

María Estela López-López<sup>1</sup>, Carmen Lizette Del-Toro-Sánchez<sup>2</sup>, Salvador Ochoa-Ascencio<sup>3</sup>, José Antonio Aguilar-López<sup>4</sup>, Oliviert Martínez-Cruz<sup>2</sup>, Jaime Alberto Madrigal-Pulido<sup>1</sup>, Miguel Angel Robles-García<sup>1</sup>, Ariadna Thalia Bernal-Mercado<sup>2</sup>, María Guadalupe Ávila-Novoa<sup>1</sup>, Pedro Javier Guerrero-Medina<sup>1</sup>, Melesio Gutiérrez-Lomelí<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biotecnología Microbiana y Alimentaria, Departamento de Ciencias Básicas. Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad, No.1115, Col. Lindavista, C.P. 47810, Ocotlán, Jalisco. México

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

<sup>3</sup> Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Campus Uruapan. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, C.P. 60170, Uruapan, Michoacán, México.

<sup>4</sup> Coordinación de Genómica Alimentaria, Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCM). Avenida Universidad 3000, Col. Lomas de la Universidad, C.P. 59103, Sahuayo, Michoacán, México.

## RESUMEN

Algunas especies del género *Trichoderma* poseen la capacidad de parasitar hongos patógenos de plantas. Esta característica propicia un alto potencial de uso en el control de las enfermedades (antracnosis) causadas por hongos en el fruto de aguacate postcosecha. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue el aislamiento e identificación de cepas nativas de *Trichoderma* de cultivos de aguacate con potencial antagonista *in vivo* e *in vitro* contra patógenos de este fruto. Las cepas fueron aisladas de raíz y suelo del huerto de aguacate en la localidad de Tanaxuri, Michoacán. Se obtuvieron seis cepas y se caracterizaron como TSONM1 (*Trichoderma* spp.), TRONM2 (*Trichoderma* spp.), TSONM3 (*Trichoderma* spp.), TSONM4 (*Trichoderma* spp.), TSONM5 (*Trichoderma* spp.) y TSONM6 (*Trichoderma harzianum*). Posteriormente, las cepas aisladas fueron confrontadas con *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *Phomopsis perseae* observándose inhibiciones *in vitro* mayores al 80 %. Mientras que en la evaluación *in vivo*, la cepa TSONM6 (*Trichoderma harzianum*) presentó mayor actividad antagónica contra *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae*. Adicionalmente, los frutos de aguacate tratados con TSONM6, presentaron mínimos porcentajes (< 2 %) de pudrición de la pulpa y pedúnculo. Por lo tanto, *Trichoderma harzianum* podría ser una buena alternativa para el control biológico del aguacate en postcosecha.

**Palabras clave:** Antracnosis, control biológico, frutos de aguacate, *Trichoderma harzianum*.

## ABSTRACT

Some species of the genus *Trichoderma* have the ability to parasitize fungal plant pathogens. This characteristic provides a high potential for use in the control of diseases (anthracnose) caused by fungi in post-harvest avocado fruit.

Therefore, the objective of this research was the isolation and identification of native *Trichoderma* strains from avocado cultures with antagonistic potential *in vivo* and *in vitro* against pathogens of this fruit. The strains were isolated from the root and soil of the avocado in the town of Tanaxuri, Michoacán. Six strains were obtained and characterized as TSONM1 (*Trichoderma* spp.), TRONM2 (*Trichoderma* spp.), TSONM3 (*Trichoderma* spp.), TSONM4 (*Trichoderma* spp.), TSONM5 (*Trichoderma* spp.) and TSONM6 (*Trichoderma harzianum*). Subsequently, the isolated strains were confronted with *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. and *Phomopsis perseae*, observing *in vitro* inhibitions greater than 80 %. In the *in vivo* evaluation, the TSONM6 strain (*Trichoderma harzianum*) showed greater antagonistic activity against *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. and *P. perseae*. Additionally, the avocado fruits treated with TSONM6, presented minimum percentages (< 2 %) of pulp and peduncle rotting. Therefore, *Trichoderma harzianum* could be a good alternative for postharvest biological control of avocado.

**Key words:** Anthracnose, avocado fruits, biological control, *Trichoderma harzianum*.

## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) variedad Hass, es uno de los productos más exitosos de la exportación agroalimentaria en México. En los últimos años la demanda mundial de este fruto se incrementado considerablemente (SIAP, 2021). Los frutos de aguacate son susceptibles a enfermedades postcosecha como la antracnosis y a la pudrición peduncular causada por varias especies de hongos incluyendo a *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *Phomopsis perseae* (Hartill y Everett, 2002; Santos et al., 2011; Twizeyimana et al., 2013). Las enfermedades de los frutos en postcosecha se manifiestan principalmente

durante el proceso de maduración y se potencian debido a los daños mecánicos, desórdenes fisiológicos, temperatura inadecuada de almacenamiento, largos periodos de refrigeración, época de cosecha y edad del fruto, entre otros (Arpaia *et al.*, 2018; Bowen *et al.*, 2018).

La antracnosis es la fuente principal de pérdidas pre y postcosecha ya que ocasiona una reducción en la calidad y cantidad de los productos, y ocurre en la mayoría de las zonas productoras de aguacate del mundo (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011). Las pérdidas pueden llegar hasta el 100 % dependiendo del patógeno y las condiciones climáticas (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016). El principal método se basa en la aplicación de fungicidas químicos no biodegradables (Everett *et al.*, 2011). Sin embargo, el empleo excesivo de plaguicidas sintéticos está ocasionando daños en la salud humana, el medio ambiente, la biodiversidad y la seguridad alimentaria, lo que ha provocado un rechazo generalizado hacia el control químico de plagas en la producción agrícola (Kniss y Coburn, 2015; Sarwar, 2015; Ibrahim, 2016). Esta problemática ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de enfermedades de plantas, que sean ecológicas y económicamente viables (Rios *et al.*, 2016), y con ello, reducir el impacto negativo de los agroquímicos al medio ambiente (Companiononi *et al.*, 2019).

El control biológico de enfermedades de plantas, incluyendo patógenos fúngicos, ha sido considerado como un método alternativo viable para el control químico (Heydari y Pessarakli, 2010). En este sentido, varias especies del género *Trichoderma* son utilizadas como agentes de control biológico, debido a su adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas (Druzhinina *et al.*, 2011), así como a su habilidad antagónica, conocida como hiperparasitismo necrotrófico o micoparasitismo contra fitopatógenos (Kubicek *et al.*, 2011). Además de los efectos beneficiosos que ocurren en las interacciones con agentes patógenos, especies de *Trichoderma* spp. presentan un efecto positivo en plantas mejorando sus propiedades como la biomasa, rendimiento y calidad, en la mayor parte de cultivos agrícolas en donde se utilizan (Mesa-Vanegas *et al.*, 2019). Por otro lado, las especies del género *Trichoderma* muestran un alto nivel de diversidad genética y pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de productos de interés comercial y ecológico (Lorito *et al.*, 2010).

Por todo lo anterior, el objetivo de esta investigación fue caracterizar e identificar cepas de *Trichoderma* aisladas directamente del cultivo de aguacate en huertos comerciales en la localidad de Tanaxuri, Michoacán, así como determinar su efectividad en el control biológico de hongos causantes de pudriciones postcosecha de aguacate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y fitopatógenos

Se usaron frutos de aguacate Hass cosechados en estado de madurez fisiológica (21.5 % de materia seca, de acuerdo con los límites establecidos de la Norma Mexicana NMX-FF-016-SCFI-2006) en el año 2018 obtenidos del huerto orgánico Negrete, ubicado en la localidad de Tanaxuri, Mi-

choacán (Latitud 19° 25' 2" Norte, Longitud 102° 3' 0" Oeste). Los fitopatógenos utilizados en la presente investigación (*Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *Phomopsis perseae*), fueron obtenidos del cepario del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo campus Uruapan Michoacán; aislados a partir de frutos de aguacate postcosecha colectados en huertos aguacateros en Uruapan Michoacán.

### Aislamiento de cepas de *Trichoderma*

El aislamiento de cepas se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Ceja-Torres *et al.* (2000). Se colectaron muestras de 150 g de suelo y raíz (tomando de los primeros 15 cm de profundidad). De las raíces se realizaron cortes de 1 cm<sup>2</sup> y, se desinfectaron con un lavado con hipoclorito de sodio al 2 % por 3 min, posteriormente los cortes se lavaron dos veces con agua destilada estéril agitando hasta lograr una mezcla homogénea y se colocaron en cajas petri con agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés, BD Bioxon) suplementado con 0.025 mg/mL de cloranfenicol (Sigma) y se incubaron a 28 °C durante 2 a 4 días. Los crecimientos obtenidos se transfirieron en nuevas cajas Petri con medio PDA, utilizando un asa de platino, posteriormente, se realizó el aislamiento de colonias individuales a través de cultivos monospóricos. Para los aislamientos a partir de muestras de suelo, se pesaron 10 g y se suspendieron en 90 mL de agua destilada estéril. Finalmente, se efectuaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 1 x 10<sup>3</sup> conidios por mL. Se tomaron 20 µL de la dilución y se sembraron en cajas de Petri con medio PDA con 0.025 mg/mL de cloranfenicol. Para asegurar la autenticidad y pureza de las cepas obtenidas, se realizaron cultivos monoconidiales como indica Samuels *et al.* (2006).

### Caracterización e identificación de las cepas aisladas de *Trichoderma*

A) Caracterización morfológica. Tradicionalmente se examinaron i) características macroscópicas de la colonia (crecimiento radial, color del micelio, presencia de pigmentos difusibles, anillos concéntricos), y ii) características microscópicas (forma y tamaño de conidióforos, fialides, conidios y clamidosporas), basadas en Samuels *et al.* (2002 y 2012).

B) Identificación molecular. La identificación molecular se basó en la amplificación por PCR de fragmentos de la región del ADN (regiones ITS) y del factor de elongación 1-alfa (*Tef 1-α*). La extracción del ADN genómico se realizó empleando el protocolo descrito por Cenís (1992). Para la amplificación por PCR se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Chakraborty *et al.* (2010) para la región del ADNr [ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')], y los reportados por Komon-Zelazowska *et al.* (2007) para el gen *Tef 1-α* [*tef 728f* (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') y *tef 1R* (5'-GCCATCCTGGGAGATACCAGC-3')]. En cada reacción de PCR se utilizaron 20 ng de ADN, buffer 1 X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs,

0.6 µM de cada iniciador, 0.2 U de Taq polimerasa (Platinum® Taq DNA polymerase, Invitrogen), para un volumen final de 20 µL. Las condiciones de amplificación para ambos fragmentos incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos de ADN amplificados se recuperaron por electroforesis en gel agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio y visualizado en transiluminador (marca: Labnet; modelo: TM-26) posteriormente los fragmentos se purificaron utilizando el kit "PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification" (Invitrogen). Se obtuvo la secuencia en ambas direcciones de los fragmentos purificados (Laboratorio LANGE BIO – CINVESTAV Irapuato, Gto.) y las secuencias se compararon, con las secuencias nucleotídicas de hongos de la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI) empleando la herramienta BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de *Trichoderma*

Para conocer la capacidad de inhibición las cepas de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos empleados, se realizaron pruebas de confrontación, usando el protocolo descrito por Ibarra-Medina *et al.* (2010) con ligeras modificaciones. Se activaron las cepas monoconidiales a 28 °C durante 96 h en medio PDA. Para la confrontación, se colocaron discos de micelio de (5 mm de diámetro) de *Trichoderma* creciendo en PDA en un extremo de una caja de Petri y del hongo fitopatógeno en el extremo opuesto. Posteriormente, se incubaron a 28 °C durante 7 días. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se tomaron lecturas cada 12 h para determinar el número de horas al primer contacto entre las hifas del antagonista y el fitopatógeno, así como el comportamiento en general. Se midió el crecimiento de ambas colonias (cm) y se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial (ICR), basándose en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ICR} = \frac{\text{CREC. DE LA CEPA ANTAGONISTA (CM)}}{6.5} * 100$$

Donde: CREC= crecimiento radial de la cepa antagonista (cm), 6.5 = distancia en cm entre los puntos de siembra de las cepas de *Trichoderma* y el fitopatógeno.

### Evaluación *in vivo* de la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* (TSONM6)

Con el fin de realizar estudios de inhibición en el fruto de aguacate, se obtuvieron los conidios de la cepa que presentó mayor capacidad *in vitro* e identificada molecularmente *T. harzianum* y se procedió de acuerdo a la metodología propuesta por Ibarra-Medina *et al.* (2010). Se cultivó *T. harzianum* en medio PDA a 28 °C por siete días y se verificó la producción de conidios. Posteriormente, a la placa de Petri se le añadieron 10 mL de tween 80 estéril a una concentración al 0.1 % y se estrió con una espátula de Drigalsky para la recupe-

ración de los conidios. Seguido de esto, se filtró la suspensión de conidios, recuperándose en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, a través de una fibra de poliéster para eliminar restos de micelio. Los conidios se contabilizaron en cámara Neubauer y se mantuvieron en tween 80 a una concentración de 0.01 % a 4 °C hasta su uso. Los hongos fitopatógenos se cultivaron en PDA, a 25 °C por 7 días.

Posteriormente, para realizar el ensayo *in vivo* (frutos) se siguió el protocolo descrito por Janisewicz *et al.* (1988), con algunas modificaciones. En condiciones controladas y en frutos uniformes en cuanto a tamaño y madurez fisiológica, se llevó a cabo la inoculación de una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios por mL de *T. harzianum* en el área peduncular del fruto de aguacate con madurez fisiológica, previamente desinfectado (por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron por escurrimiento). Se realizó la inoculación de cada uno de los fitopatógenos colocando un disco de PDA de 5 mm con crecimiento activo en la misma zona en donde se inocularon los conidios de *Trichoderma*. Posteriormente, se incubaron por 7 días a  $18 \pm 2$  °C a 95 % de humedad relativa. El experimento se dividió en cuatro grupos por triplicado. Tratamiento 1: Testigo (conidios de *T. harzianum*); Tratamiento 2: Testigo del fitopatógeno (disco de PDA con micelio de fitopatógeno); Tratamiento 3: Confrontación (conidios de *T. harzianum* más disco de PDA con micelio de fitopatógeno) y Tratamiento 4: Agua destilada estéril.

Al concluir el periodo de incubación se evaluó el efecto de los inóculos en las áreas pedunculares a través de la comparación de cortes longitudinales en los frutos y se determinó el porcentaje de daños basados en escalas de pudriciones de pedúnculo y cuerpo del fruto (Figura 1; Ochoa, 2014). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

### Análisis estadístico.

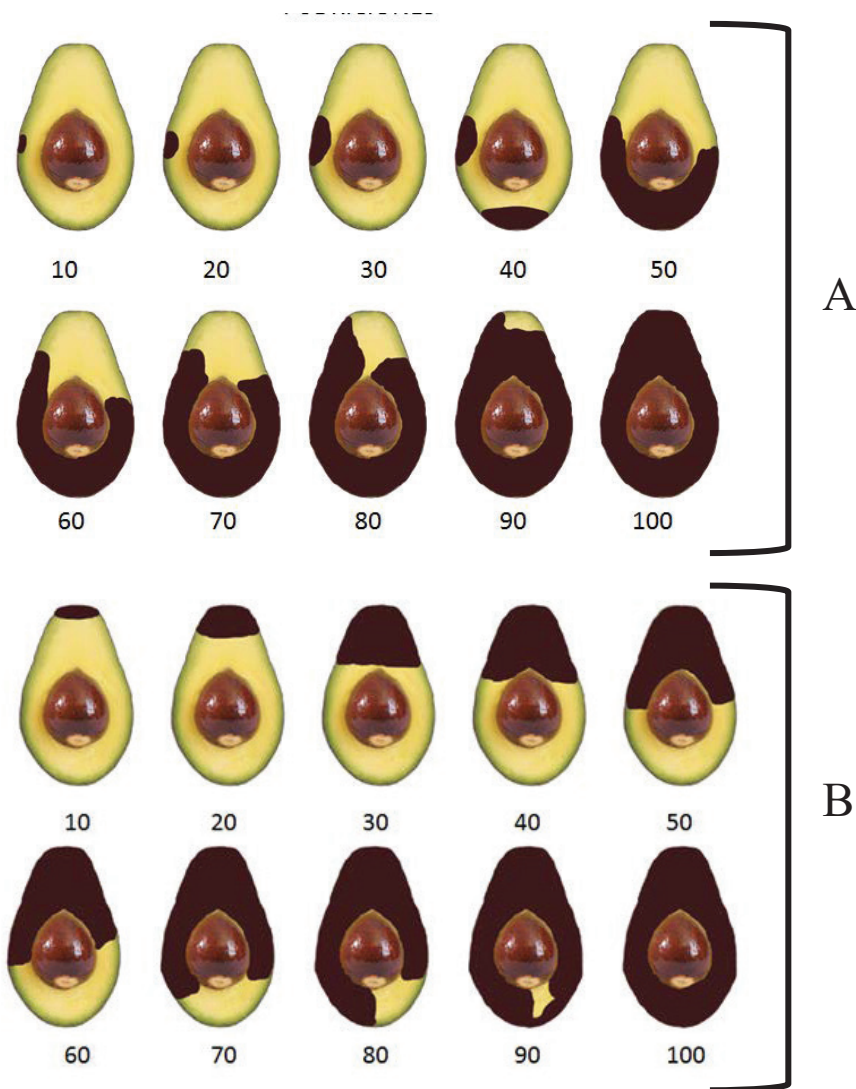
Se llevó a cabo un diseño factorial. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA), seguidos de la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD) con un nivel de confianza del 95 %, usando el programa Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

## RESULTADOS

### Aislamiento e identificación de las cepas de *Trichoderma*

Se obtuvieron seis aislamientos de cepas nativas de suelo y raíz, de acuerdo con las características morfológicas (micro y macroscópicas) se identificaron como de *Trichoderma* sp. (Tabla 1). Se analizaron los conidios, fálides, hifas y conidióforos presentes en el soma vegetativo. De acuerdo con la velocidad de crecimiento observada en cada aislado, se seleccionó la cepa TSONM6, para ser identificada molecularmente y utilizada en el ensayo *in vivo*. Al efectuar el análisis de la secuencia, se identificó como *Trichoderma harzianum*, mostrando un amplicón de 600 pb para ambos fragmentos,





**Figura 1.** Escala de porcentaje de pudrición del cuerpo del fruto (A) y del pedúnculo (B) del fruto de aguacate. Imagen adaptada del compilado de la guía realizada por Ochoa (2014).  
**Figure 1.** Rottage percentage scale of fruit body (A) and peduncle (B) of avocado fruit. Image adapted from the compilation of the guide made by Ochoa (2014).

evidenciando una identidad del 99.59 y 96.43 % con ambos marcadores (ITS y gen *Tef 1-a*, respectivamente) (Tabla 2).

#### Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de las cepas de *Trichoderma*

Los aislados de *Trichoderma* TSONM1, TRONM2, TSONM3, TSONM4, TSONM5 y *T. harzianum* presentaron diferentes niveles de actividad antagonista contra los fitopatógenos ensayados (*N. parvum*, *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae*). La confrontación, permitió evidenciar a la cepa de *T. harzianum* con mayor capacidad antagonista frente a *N. Parvum* con 88.8 % de inhibición, misma que fue estadísticamente significativa al igual que la cepa TSONM3 Y TSONM5. Por otro lado, el resto de las cepas se mantuvieron en el rango del 73.8 al 77.2 % (Tabla 3), no observándose diferencias significativas entre ellas.

En la confrontación de las cepas aisladas contra *C. gloeosporioides* (Tabla 3), se determinó que las cepas de mayor actividad antagonista fueron TSONM1, TRONM2 y TSONM3 con 75.0 % de inhibición, no mostrando diferencias significativas entre ellas al igual que las cepas TSONM5 y *T. harzianum* que formaron el mismo grupo pero que presentaron un 72.7 y 73.8 % de inhibición, respectivamente. En tanto a las cepas que dieron mayor inhibición en la confrontación de *Diaporthe* sp. (Tabla 3) fue *T. harzianum* con un 82.2 %, y de acuerdo al análisis estadístico fueron estadísticamente similares a las cepas TSONM1, TSONM3 y la TSONM5 al no mostrar diferencias significativas. Por último, en la confrontación con *P. perseae* (Tabla 3), las cepas TSONM1, TSONM3, TSONM4, TSONM5 y *T. harzianum* fueron estadísticamente iguales en cuanto a su actividad de inhibición, presentando porcentajes de inhibición entre 80.0 – 84.4 %. Se encontró

**Tabla 1.** Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Trichoderma* de Tanaxuri, Michoacán.**Table 1.** Isolation and identification of native *Trichoderma* strains from Tanaxuri, Michoacán.

Código	Material	Cepa identificada	Características microscópicas	Características macroscópicas
TSONM1	Suelo	<i>Trichoderma</i> spp.	Forma y color de la hifa fúngica típica, filíde (largas, delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas), forma y color de los conidióforos (diversas ramificaciones con aspecto piramidal), forma y color de los conidios (citriformes y subglobosos) y clamidosporas de forma individual.	Velocidad de crecimiento rápido, color del micelio que es eventualmente blanco y se torna verde intenso y abundante, con la formación de masas conidiales en anillos concéntricos.
TRONM2	Raíz	<i>Trichoderma</i> spp.		
TSONM3	Suelo	<i>Trichoderma</i> spp.		
TSONM4	Suelo	<i>Trichoderma</i> spp.		
TSONM5	Suelo	<i>Trichoderma</i> spp.		
TSONM6	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i> *		

\*Caracterizado molecularmente.

**Tabla 2.** Identificación molecular de la cepa de *Trichoderma harzianum*.**Table 2.** Molecular identification of the *Trichoderma harzianum* strain.

Código	Cepa identificada	Región ITS		Gen <i>Tef 1-a</i>	
		% Identidad	Número de accesión (GenBank)	% Identidad	Número de accesión (GenBank)
TSONM6	<i>Trichoderma harzianum</i>	99.59	ON407085	96.43	ON423614

Accesado el 6 de junio de 2022.

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* contra los fitopatógenos.**Table 3.** *Trichoderma* strains *in vitro* inhibition percentage against phytopathogens.

Cepa aislada	Porcentaje de inhibición			
	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Phomopsis perseae</i>
TSONM1	76.6 ± 1.6 <sup>b</sup>	75.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	77.2 ± 2.5 <sup>ab</sup>	80.0 ± 2.9 <sup>ab</sup>
TRONM2	73.8 ± 3.4 <sup>b</sup>	75.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	75.5 ± 1.0 <sup>b</sup>	77.7 ± 2.5 <sup>b</sup>
TSONM3	78.8 ± 4.2 <sup>ab</sup>	75.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	78.3 ± 1.7 <sup>ab</sup>	84.4 ± 1.9 <sup>a</sup>
TSONM4	75.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	71.1 ± 1.0 <sup>b</sup>	76.1 ± 3.8 <sup>b</sup>	81.1 ± 2.5 <sup>ab</sup>
TSONM5	77.2 ± 8.6 <sup>ab</sup>	72.7 ± 1.9 <sup>ab</sup>	80.0 ± 4.4 <sup>ab</sup>	83.3 ± 5.0 <sup>ab</sup>
TSONM6 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	88.8 ± 5.4 <sup>a</sup>	73.8 ± 1.9 <sup>ab</sup>	82.2 ± 3.8 <sup>a</sup>	82.2 ± 5.4 <sup>ab</sup>

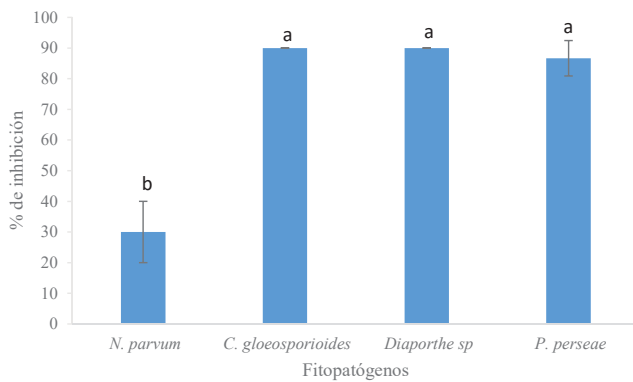
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

que todas las cepas nativas de *Trichoderma* fueron efectivas al controlar a los cuatro hongos fitopatógenos. Sin embargo, es importante destacar que la cepa de *T. harzianum* mostró actividades de inhibición superiores al 80 % contra *N. parvum*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae*, aunado a esto, al ser la cepa que se caracterizó molecularmente, se seleccionó para continuar con los estudios *in vivo* en el fruto de aguacate.

#### Evaluación *in vivo* de la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* (TSONM6)

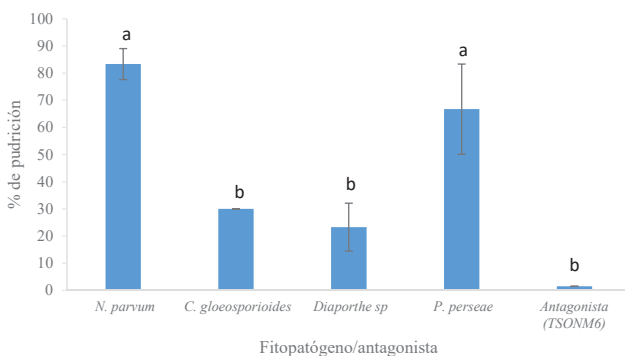
De acuerdo a la escala de porcentaje de pudrición del cuerpo del fruto y del pedúnculo del fruto de aguacate (Figura 1). Los hongos fitopatógenos mejor inhibidos por la cepa antagónica de *T. harzianum* a siete días de incubación

fueron *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae* con aproximadamente 90 % de inhibición, no habiendo diferencia significativa entre ellos ( $p > 0.05$ ) (Figura 2). La cepa de *T. harzianum* mostró menor eficiencia para inhibir a *N. parvum* cuyo porcentaje de inhibición fue de 30 %. Por otro lado, al comprobar el comportamiento de la cepa de *T. harzianum* y los fitopatógenos en frutos de aguacate, se demostró que *N. parvum* y *P. perseae* presentaron mayor agresividad en la forma de colonizar la pulpa en los frutos con pudrición de 83.3 y 66.7 %, respectivamente (Figura 3), y en menor medida *C. gloeosporioides* y *Diaporthe* sp. mostraron entre un 30 y 23.3 % de pudrición, respectivamente (Figura 3). Por el contrario, en los frutos testigos en el cual se inoculó la cepa de *T. harzianum*, no se desarrollaron síntomas de pudrición.



**Figura 2.** Inhibición *in vivo* de la cepa nativa *Trichoderma harzanium* (TSONM6) contra los diferentes fitopatógenos. Letras diferentes entre los distintos patógenos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2.** *In vivo* inhibition of the native strain *Trichoderma harzanium* (TSONM6) against the different phytopathogens. Different letters between the different pathogens indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** Porcentaje de pudrición en frutos de aguacate inoculados con fitopatógenos y la cepa antagonista TSONM6 (*Trichoderma harzanium*). Letras diferentes entre los distintos patógenos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** Rottage percentage in avocado fruits inoculated with phytopathogens and the antagonistic strain TSONM6 (*Trichoderma harzanium*). Different letters between the different pathogens indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

### Aislamientos de *Trichoderma*

El aislamiento del género *Trichoderma* obtenido de los sitios de interés para este estudio, prevaleció en suelo como material de procedencia. Al igual que en el estudio de Zafari *et al.* (2013), se aislaron cepas de *Trichoderma* lo cual sugiere que hay un amplio dominio de este género sin importar el cultivo ni las condiciones bióticas y abióticas. *Trichoderma* es fácilmente aislado del suelo por métodos convencionales, en gran parte debido a su rápido crecimiento, abundante conidiación, formación de clamidosporas y colonización de sustratos orgánicos, lo que facilita un rápido desarrollo en varios sustratos (Gupta *et al.*, 2014). Sin embargo, el aislamiento de *Trichoderma*, puede deberse a varios factores limitantes, por lo que se puede atribuir a la época de invierno en que se efectuaron los muestreos, los cuales se caracterizan por temperaturas bajas y humedades relativas altas. Sin embargo, *Trichoderma* puede ser afectado por la interacción con diversos factores bióticos y abióticos (actividad de agua,

temperatura, oxigenación y pH), mismos que comprometen su desempeño como biocontrolador (Santamarina *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2013). Aunado a lo anterior, la cantidad de materia orgánica, así como las condiciones climáticas, edáficas y geográficas que se tienen en la región de Michoacán, pueden afectar el desarrollo y desempeño de *Trichoderma*. Wang *et al.* (2016), mencionan que la ocurrencia de la especie de *Trichoderma* es modulada por varios factores incluyendo microclima, la disponibilidad de sustratos, así como también interacciones de complejos ecológicos.

### Identificación de las cepas aisladas de *Trichoderma*

Aunque los microorganismos pueden ser identificados basados en sus caracteres morfológicos, las técnicas moleculares son hoy en día, más ampliamente utilizadas, y en general, son herramientas más aceptadas para la identificación ya que ofrecen información rápida y confiable para el estudio de identidad (Gajera y Vakharia, 2010). Las secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) y regiones como el factor de elongación 1- $\alpha$  (*Tef 1-a*) son las más utilizadas en la identificación, las cuales actúan como huellas dactilares en la identificación de los hongos (Fernández-Ortuño *et al.*, 2010).

La amplificación del segmento de interés fue similar a lo obtenido por Alvarado-Marchena y Rivera-Méndez (2016), quien aisló e identificó molecularmente cepas *Trichoderma* en áreas de producción de ajo y cebolla. Por la alta similitud obtenida en el alineamiento múltiple de las secuencias, se comprueba que los marcadores ITS y *Tef 1-a* son técnicas confiables para la identificación de *Trichoderma* spp. (Rios *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). El uso de la base de datos (GenBank NCBI) demostró que, a través de la región amplificada de ADN de las cepas estudiadas, fue factible determinar la identidad que oscilaron entre 99.59 y 96.43 % con las especies identificadas como *Trichoderma harzianum* en la base de datos. Esta especie es usada ampliamente para el control biológico de patógenos de plantas (Steindorff *et al.*, 2014; Troian *et al.*, 2014).

### Capacidad antagonista *in vitro* de las cepas de *Trichoderma*

El aislamiento de hongos por sí solo no es una garantía de que estos aislados sean buenos antagonistas, por lo que es necesario llevar a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar su capacidad antagónica frente al fitopatógeno de interés (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). Además, evaluar su efectividad biológica en plantas bajo diferentes condiciones. Lo anterior, permitirá validarlos al momento de aplicarlos en ensayos en condiciones de campo (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). El crecimiento del antagonista de *T. harzianum* reflejó la habilidad de adaptarse a condiciones de crecimiento *in vitro* y de colonizar rápidamente un espacio determinado, resultados similares fueron obtenidos en el estudio de Singh *et al.* (2014) con cepas de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum falcatum* Went. Lo que favoreció la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos, situación que se demostró en las primeras horas del enfrentamiento.



Krauss *et al.* (2010) mencionan que los bioensayos realizados con *Trichoderma* han sido efectivos y que, por su naturaleza, el control biológico no elimina, sino que reduce las poblaciones del patógeno y, como consecuencia, reduce la incidencia de la enfermedad. No obstante, a pesar de las potencialidades de estos antagonistas autóctonos, profundizar en el conocimiento de los mecanismos específicos a través de los cuales ejercen su acción, ayudará a mejorar su efectividad cuando sean aplicados como inoculantes microbianos (Villamil *et al.*, 2015). Las propiedades antagónicas de *Trichoderma* hacia hongos patógenos se basan en la activación de múltiples mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo, la antibiosis, la promoción del crecimiento vegetal, e inducción de respuestas de defensa vegetal (Albes-de-Aguiar *et al.*, 2014; Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015). La aplicación de *Trichoderma* es basada en el entendimiento de estos mecanismos de acción contra un largo set de bacterias y hongos, en ciertos casos infecciones virales (Keswani *et al.*, 2014), lo que le permite ser un buen candidato para el control biológico debido a los diferentes modos de acción que tienen para inhibir el crecimiento de otros hongos.

Se ha reportado que *Trichoderma* excreta una variedad de metabolitos secundarios con la finalidad de inducir la comunicación molecular mediante la inducción de las señalizaciones químicas, contribuyendo al establecimiento de interacciones con otros microorganismos en diversas vías para el control de los patógenos (Keswani *et al.*, 2014). Algunos de los metabolitos secundarios de importancia agrícola sintetizados por especies de *Trichoderma* se relacionan con compuestos volátiles y no volátiles con actividad antimicrobiana y defensa vegetal, destacando diterpenos tetracíclicos (harziandiona), sesquiterpenos (tricotecenos y tricodermina), y el triterpeno viridin (Zeilinger *et al.*, 2016), que confieren sus propiedades como agente de biocontrol hacia organismos fitopatógenos (Asad *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

#### Capacidad antagónica *in vivo* de *Trichoderma harzianum* (TSONM6)

La cualidad natural que ejercen los antagonistas sobre los diversos fitopatógenos en la actualidad a ganado utilidad, no obstante, para aplicarlos de forma exitosa es primordial discernir los diversos mecanismos de acción que presentan las cepas. Uno de los principales mecanismos es que, *Trichoderma* parasita las células del patógeno y degrada su pared celular, la retracción de la membrana plasmática y desorganización de citoplasma (Romero-Cortes *et al.*, 2015), por la acción hidrolítica de enzimas como quitinasas y glucanasas; otro mecanismo reportado para este hongo es la antibiosis. Cabe mencionar que los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* dependen del tipo de cepa y se han clasificado en tres categorías: 1) antibióticos volátiles como 6-pentil- $\alpha$ -pirona y aquellos derivados del isocianuro; 2) compuestos solubles en agua (ácido heptenoico) y 3) oligopéptidos ricos en ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Khan *et al.*, 2020; Thapa *et al.*, 2020).

El daño ocasionado por los patógenos fúngicos en frutos postcosecha fue observado a diferentes grados, lo que se relaciona con una dependencia de factores extrínsecos tales como tiempo de exposición, temperatura y humedad. Aunado a estos factores se encuentra el ciclo vital propio de cada patógeno. No siempre se ha observado consistencia al extrapolar los resultados del laboratorio a condiciones *in situ*. Se han obtenido respuestas contradictorias cuando se trata de relacionar el daño celular en el fruto con el compuesto producido por el antagonista (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

Domínguez-Guerrero *et al.* (2012), encontraron que las diferentes especies de *Colletotrichum* spp. tienen gran variabilidad genética y molecular, causando que el grado de daño sea variable entre ellas. Por esta misma razón, Trinidad-Angel *et al.* (2017) observaron que los primeros signos de la antracnosis en la evaluación *in vivo* comenzaron a aparecer entre el tercer y cuarto día de incubación y el daño fue en aumento al comenzar la maduración del fruto. Lo que puede deberse a que se trata de una enfermedad latente; es decir, la infección se presenta en estados tempranos del desarrollo del fruto e incluso desde la floración, y se mantiene latente hasta que el fruto alcanza las condiciones óptimas como son la máxima producción de etileno, misma que desencadena eventos enzimáticos que estimulan el desarrollo del hongo, así como la disminución de la concentración de algunos compuestos que inhiben el desarrollo del mismo (Alarcón-Restrepo y Chavarriaga-Montoya, 2007).

Por otro lado, en este estudio se visualizó una mayor susceptibilidad a la infección por *N. parvum*. Ochoa (2014) menciona que, durante la maduración, los niveles de compuestos antifúngicos en el fruto declinan, lo que permite que se active el crecimiento del hongo. Las células más externas de la cutícula y de la pulpa son colonizadas, llevando el desarrollo de los síntomas. Considerando que la inoculación de fitopatógeno sobre los frutos tuvo una concentración de  $1 \times 10^6$  de esporas por mL, sería importante considerar lo mencionado por Gupta *et al.* (2014), donde describe que, en su mayoría, los productos comerciales del mercado se formulan con una concentración de antagonista entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  UFC esporas viables/gramo de producto formulado. Por lo que *T. harzianum* (TSONM6) podría ser una buena alternativa para el control biológico del aguacate en postcosecha.

#### CONCLUSIONES

Se logró aislar e identificar a nivel género seis cepas de *Trichoderma* de raíz y suelo de cultivos de aguacate, con la capacidad de inhibir *in vitro* a los patógenos *N. parvum*, *P. perseae*, *C. gloeosporioides* y *Diaporthe* sp. La cepa TSONM6, identificada molecularmente como *Trichoderma harzianum*, mostró la mayor capacidad antagónica principalmente contra los patógenos del aguacate *C. gloeosporioides*, *Diaporthe* sp. y *P. perseae*. Por lo tanto, esta cepa puede utilizarse en frutos de aguacate postcosecha para el control de la antracnosis y así aumentar la calidad y cantidad de este cultivo, impactando significativamente en la economía. Sin embargo, aún

falta discernir los mecanismos de acción precisos implicados en la actividad de esta cepa en el control biológico, lo que permitirá seleccionar cepas nuevas, eficaces y que a la vez facultará un uso adecuado en el cultivo de aguacate.

## REFERENCIAS

- Alarcón-Restrepo, J.J. y Chavarriaga-Montoya, W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz & Sacc. en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agronomía*. 15: 89-102.
- Alvarado-Marchena, L. y Rivera-Méndez, W. 2016. Molecular identification of *Trichoderma* spp. in garlic and onion fields and *in vitro* antagonism trials on *Sclerotium cepivorum*. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. 40(2016): 1-9. doi:10.1590/18069657rbcs20150454.
- Arpaia, M.L., Collin, S., Sievert, J. y Obenland, D. 2018. 'Hass' avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. *Postharvest Biology and Technology*. 140: 76-84. doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.02.015.
- Asad, S.A., Tabassum, A., Hameed, A., Afzal, A., Khan, S.A. y Ahmed, R. 2015. Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(4): 1053-1064. doi: 10.1590/S1517-838246420140787.
- Bowen, J., Billing, D., Connolly, P., Smith, W., Cooney J. y Burdon J. 2018. Maturity, storage and ripening effects on anti-fungal compounds in the skin of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 146: 43-50. doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.08.005.
- Ceja-Torres, L.F., Téllez-Ortiz, D., Osada-Kawasoe, S. y Morales-García, J.L. 2000. Etiología, distribución e incidencia del chancro del aguacate *Persea americana* Mill en cuatro municipios del Estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18(2): 79-86.
- Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20(9): 2380. doi: 10.1093/nar/20.9.2380.
- Chakraborty, B.N., Chakraborty, U., Saha, A., Dey, P.L. y Sunar, K. 2010. Molecular characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* isolated from soils of North Bengal based on rDNA markers and analysis of their PCR-RAPD Profiles. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 5(1): 55-61.
- Chen, J.L., Sun, S.Z., Miao, C.P., Wu, K., Chen, Y.W., Xu, L.H., Guan, H.L. y Zhao, L.X. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*. 40(4): 315-324. doi: 10.1016/j.jgr.2015.09.006.
- Companiononi, G.B., Domínguez, A.G. y García, V.R. 2019. *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biología Vegetal*. 19(4): 237-248.
- Albes-de-Aguiar, R., Gomes-da-Cunha, M. y Lobo-Junior, M. 2014. Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. and chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biological Control*. 74: 1-5. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.03.009.
- Domínguez-Guerrero, I.P., Mohali-Castillo, S.R., Marín-Montoya, M.A. y Pino-Menesini, H.B. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de pal aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology*. 37(2): 108-122. doi: 10.1590/S1982-56762012000200003.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V. y Kubicek, C.P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology*. 9(10): 749-759. doi: 10.1038/nrmicro2637.
- Everett, K.R., Pak, H.A., Pushparajah, I.P.S., Taylor, J.T., Astill, M.S., King, D.B. y Chee, A.A. 2011. Field evaluation of fungicides to control postharvest rots of avocados in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*. 64: 112-118. doi: 10.30843/nzpp.2011.64.5971.
- Fernández-Ortuño, D., Loza-Reyes, E., Atkins, S.L. y Fraaije, B.A. 2010. The CYP51C gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 144(2): 301-309. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.013.
- Gajera, H.P. y Vakharia, D.N. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74(3-4): 274-282. doi: 10.1016/j.pmpp.2010.04.005.
- Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I. y Tuohy, M.G. 2014. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier Science. pp 1-650.
- Hartill, W.F.T. y Everett, K.R. 2002. Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots 'Hass' avocado (*Persea americana*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 30(4): 249-260. doi: 10.1080/01140671.2002.9514221.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Baustista-Baños, S., Velázquez-del-Valle, M.G. y Hernández-Rodríguez, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(1): 66-74.
- Hernández-Melchor, D.J., Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*. 35(1): 98-112.
- Heydari, A. y Pesarakli, M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4): 273-290. doi: 10.3923/jbs.2010.273.290.
- Ibarra-Medina, V.A., Ferrera-Cerrato, R., Alarcon, A., Lara-Hernández, M.E. y Valdez-Carrasco, J.M. 2010. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotia sclerotium* y *Sclerotia minor*. *Revista Mexicana de Micología*. 31: 53-63.
- Ibrahim, Y.A. 2016. Health and environmental impacts of pesticides: A responsibility principle and two novel systems for hazard classification and external cost determination. *Journal of Toxicology and Health*. 3: 1-9. doi: 10.7243/2056-3779-3-1.
- Janisewicz, W.J. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology*. 78(2): 194-198. doi: 10.1094/Phyto-78-194.

- Keswani, C., Mishra, S., Kumar-Sarma, B., Pratap-Singh, S. y Bahadur-Singh, H. 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Applied Microbiology and Biotechnology. 98(2): 533-544. doi: 10.1007/s00253-013-5344-5.
- Khan, K.A.A., Najeeb, S., Hussain S., Xie, B. y Li, Y. 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp against phytopathogenic fungi. Microorganisms 8(6): 817. doi: 10.3390/microorganisms8060817.
- Kniss, A.R. y Coburn, C.W. 2015. Quantitative evaluation of the environmental impact quotient (EIQ) for comparing herbicides. PloS One. 10(6): 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0131200.
- Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C.P. y Druzhinina, I.S. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause worldwide green mold disease in oyster mushroom farms. Applied and Environmental Microbiology. 73(22): 7416-7426. doi: 10.1128/AEM.01059-07.
- Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., García, J., Crozier, J., Brown, N.A., Hoopen, G.M. y Holmes, K. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). Biological Control. 54: 230-240. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2010.05.011.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., *et al.* 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Genome Biology. 12(4): 2-15. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r40.
- Landeró-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F.M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L.A. y Aguado-Rodríguez, G.J. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7(5): 1189-1198. doi: 10.29312/remexca.v7i5.245.
- Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. y Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. Annual Review of Phytopathology. 48: 395-417. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314.
- Martínez, B., Infante D. y Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal. 28(1): 1-11.
- Mesa-Vanegas, A.M., Marín, A. y Calle-Osorno, J. 2019. Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. Actualidades Biológicas. 41(111): 32-44. doi: 10.17533/udea.acbi.v41n111a02.
- Norma Mexicana (NMX-FF-016-SCFI-2006). 2006. Productos alimenticios no industrializados para uso humano-fruta fresca-Aguacate (*Persea americana* Mill.). Especificaciones. Diario Oficial de La Federación. Secretaría de Economía. SINEC-20161020174655704.
- Ochoa, A.S. 2014. Enfermedades y desordenes fisiológicos más comunes del fruto de aguacate en poscosecha. APEAM AC-UMSNH. Primera edición. pp 92.
- Rios-Velasco, C., Caro-Cisneros, J.M., Berlanga-Reyes, D.I., Ruiz-Cisneros, M.F., Ornelas-Paz, J.J., Salas-Marina, M.A., Villalobos-Pérez, E. y Guerrero-Prieto, V.M. 2016. Identification and antagonistic activity in vitro of Bacillus spp. and Trichoderma spp. isolates against common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología. 34(1): 84-99. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1507-1.
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P.A., Ramírez-Lepe, M. y Cuervo-Parra J.A. 2015. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences 32(1): 32-45.
- Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A. y Petrini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia. 94(1): 146-170. doi: 10.2307/3761854.
- Samuels, G.J., Ismaiel, A., De Souza, J. y Chaverri, P. 2012. *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. Mycological Progress. 11: 215-254. doi: 10.1007/s11557-011-0743-4.
- Samuels, G.J., Suarez, C., Solis, Z.K., Holmes, K.A., Thomas, S.E., Ismaiel, A., y Evans, H.C. 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species from South America. Mycological Research. 110(Pt 4): 381-392. doi: 10.1016/j.mycres.2006.01.009.
- Santamarina, M.P. y Roselló J. 2006. Influence of temperature and water activity on the antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Verticillium* and *Rhizoctonia*. Crop Protection. 25(10): 1130-1134. doi: 10.1016/j.cropro.2006.02.006.
- Santos, J.M., Vrandečić, K., Čosić, J., Duvnjak, T. y Phillips, A.J.L. 2011. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. Persoonia. 27: 9-19. doi: 10.3767/003158511X603719.
- Sarwar, M. 2015. The killer chemicals as controller of agriculture insect pests: The conventional insecticides. International Journal of Chemical and Biomolecular Science. 1: 141-147.
- SIAP. 2021. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Aguacate. Accesado el 21 de febrero de 2021. <https://www.gob.mx/siap/documentos/brochure-aguacate>
- Silva-Rojas, H.V. y Ávila-Quezada, G.D. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. Plant Pathology. 60: 899-908. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x.
- Singh, R.K., Kumar, P., Tiwari, N.N., Singh, S.P., Tiwari, A.K., Vishwakarma, S.K., Singh, A. y Kumar, A. 2014. Role of endochitinase gene and efficacy of *Trichoderma* against *Colletotrichum falcatum* Went., causing red rot disease in sugarcane. Sugar Technology. 16: 180-188. doi: 10.1007/s12355-013-0254-5.
- Steindorff, A.S., Ramada, M.H.S., Coelho, A.S.G., Miller, R.N.G., Pappas, G.J., Ulhoa, C.J. y Ferreira-Noronha, E. 2014. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. BMC Genomics. 15: 204. doi: 10.1186/1471-2164-15-204.
- Thapa, S., Sotang, N., Kumari-Limbu, A., Joshi, A. 2020. Impact of *Trichoderma* sp. in agriculture: A minireview. Journal Biology Today's World. 9(7): 227. doi: 10.35248/2322-3308.20.09.225.
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F.J., Ulloa, J.A., Ramírez-Ramírez, J.C., Ragazzo-Sánchez, J.A., Calderón-Santoyo, M. y Bautista-Rosales, P.U. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 19: 3953-3964. doi: 10.29312/remexca.v0i19.664.



- Troian, R.F., Steindorff, A.S., Ramada, M.H., Arruda, W. y Ulhoa, C.J. 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters*. 36: 2095-2101. doi: 10.1007/s10529-014-1583-5.
- Twizeyimana, M., Förster, H., McDonald, V., Wang, D.H., Adaskaveg, J.E. y Eskalen, A. 2013. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease*. 97(12): 1580-1584. 10.1094/PDIS-03-13-0230-RE.
- Vargas-Hoyos, H.A. y Gilchrist-Ramelli, E. 2015. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*. 42: 9-16.
- Villamil-Carvajal, J.E., Viteri-Rosero, S.E. y Villegas-Orozco, W.L. 2015. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 68(1): 7441-7450. doi: 10.15446/rfnam.v68n1.47830.
- Wang G., Cao, X., Ma, X., Gou, M., Liu, C., Yan, L. y Bian, Y. 2016. Diversity and effect of *Trichoderma* spp. associated with green mold disease on *Lentinula edodes* in China. *Microbiology Open*. 5(4): 709-718. doi: 10.1002/mbo3.364.
- Zafari, D., Karimi, S. y Mohammadi, R. 2013. Identification of *Trichoderma* spp. related to root and rhizosphere of walnut in hamedan province. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 26(3): 330 -340. doi: 20.1001.1.23832592.1392.26.3.10.5.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R. y Mukherjee, P.K. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. 30(2): 74-90. doi: 10.1016/j.fbr.2016.05.001.



# Efectividad biológica de extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Biological effectiveness of *Agave striata* and *Fouquieria splendens* extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Jesús Eduardo Ramírez Méndez<sup>1</sup>, Francisco Daniel Hernández Castillo<sup>1\*</sup>, Marco Antonio Tucuch Pérez<sup>1</sup>, Isaac Irving Camacho Aguilar<sup>1</sup>, Roberto Arredondo Valdés<sup>2</sup>, José Ángel Villarreal Quintanilla<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Coahuila Facultad de Ciencias Químicas Departamento de Nanobiociencias. Saltillo, Coahuila, México. Ing. J. Cardenas Valdez S/N, Col. República, CP. 25280. Saltillo, Coahuila, México.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Botánica. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

## RESUMEN

El cancro bacteriano es una de las enfermedades del tomate (*Solanum lycopersicum*), la cual es causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). En el presente trabajo se realizó la identificación de *Cmm* mediante PCR de punto final utilizando los primers CMM5F y CMM6R. Se evaluó la efectividad de los extractos metanólicos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* sobre *Cmm* *in vitro* e invernadero, así también se obtuvo información acerca de la composición de fitoquímicos presentes en las plantas. El ensayo *in vitro* se realizó mediante la técnica de microdilución en placa desde los 3.9 mg/L a 1000 mg/L, se determinó la  $Ci_{50}$  y  $Ci_{90}$  de cada extracto. En el experimento en invernadero se evaluó el efecto de los extractos y un producto orgánico "Biobacter" contra *Cmm*, se calculó la incidencia, severidad y parámetros morfométricos. Los resultados *in vitro* indicaron que los extractos de *F. splendens* y *A. striata* presentan inhibición sobre el fitopatógeno, sin embargo, el extracto de *F. splendens* mostro control a menores concentraciones que con *A. striata*. El ensayo en invernadero demostró que la incidencia, severidad y parámetros morfométricos fue menor con el extracto de *F. splendens*, así después con el producto Biobacter.

**Palabras clave:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tomate, extractos metanólicos, efectividad biológica.

## ABSTRACT

Bacterial canker is one of the tomatoes (*Solanum lycopersicum*) diseases caused by the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). In this study, *Cmm* was identified by end-point PCR using the primers CMM5F and CMM6R. The efficacy of methanolic extracts of *Agave striata* and *Fouquieria splendens* on *Cmm* *in vitro* under greenhouse conditions was evaluated, as well as information about the composition of phytochemicals present in plants. The *in vitro* assay was performed using the plate microdilution technique from 3.9 mg/L to 1000 mg/L, the  $Ci_{50}$  and  $Ci_{90}$  of each extract was determined. In the greenhouse experiment, the effect of the extracts and an organic product "Biobacter" against *Cmm* was evaluated on incidence, severity, and

morphometric parameters. The *in vitro* results indicated that the extracts of *F. splendens* and *A. striata* showed inhibition on the phytopathogen. The greenhouse trial showed that the incidence, severity and morphometric parameters were lower with *F. splendens* extract, subsequently, with Biobacter product.

**Keywords:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tomato, methanolic extracts, biological effectiveness.

## INTRODUCCIÓN

El tomate es una de las hortalizas más importantes a nivel mundial; con una superficie cultivada durante el 2020 de 5,051,983 ha y una producción de 186,821,216 t. Los principales países productores de tomate son China, India, Turquía, Estados Unidos y Egipto, en tanto que México ocupa el noveno lugar en producción de 4,137,342 t y una superficie sembrada de 84,926 ha (FAO, 2020). México contribuye con el 19 % de volumen de las exportaciones a nivel mundial, ubicándolo como el principal país exportador por encima de España (14 %) y Países Bajos (13 %) (FAOSTAT, 2020). La producción del cultivo del tomate es afectada por diversos problemas fitosanitarios causados por plagas insectiles y microorganismos fitopatógenos tales como hongos, nematodos, bacterias y virus (Arie *et al.*, 2007). Las enfermedades bacterianas son unas de las principales problemáticas debido a su capacidad de infectar y la dificultad para ser controladas en los sistemas de producción (Calleros, 2013). Entre las principales especies bacterianas responsables de enfermedades en el tomate se encuentran *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), *Agrobacterium tumefaciens* (*At*), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) (Koike *et al.*, 2007; López, 2017). *Cmm* es conocida como "el cáncer" o "cancro bacteriano" (Davis *et al.*, 1984), es una de las principales especies de interés económico por el alto grado de pérdidas que ocasiona en el cultivo de tomate (de León *et al.*, 2011; Nandi *et al.*, 2018), las cuales pueden alcanzar el 100 % si no es controlada (EFSA, 2014; Hadas *et al.*, 2014; FIRA, 2016). Su principal fuente de inóculo es la propagación por medio de semillas infectadas, trasplantes de plantas infectadas, y restos de la planta localizada

en el suelo (Gartemann *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2010). Esta especie muestra una gran variabilidad en la virulencia (Alvarez *et al.*, 2004), pudiendo sobrevivir en restos de plantas hasta por dos años (Fatmi y Schaad, 2002; Sen *et al.*, 2018). Las estrategias de control disponibles para *Cmm* son principalmente la prevención y exclusión (Xu *et al.*, 2010; De León *et al.*, 2011), las soluciones se basan en la rotación del cultivo, buenas prácticas agrícolas y el uso de semillas sanas (Sen *et al.*, 2015; Tíreng-Karut *et al.*, 2019). Por su parte los productos químicos no han sido eficientes (Balestra *et al.*, 2009), siendo el uso de compuestos cúpricos y de antibióticos los que han mostrado mayor efecto sobre el patógeno (Milijacevic *et al.*, 2009), sin embargo, sus efectos tóxicos, su potencial de acumulación en los suelos y su capacidad para inducir resistencia en los microorganismos fitopatógenos hacia los ingredientes activos, no permite su uso en la agricultura de algunos países. Debido a lo anteriormente mencionado, se realizan trabajos de investigación para desarrollar alternativas orgánicas, amigables con el medio ambiente y que no generen resistencia en los microorganismos (Basim *et al.*, 2000; Sarwar, 2015), mediante extractos de plantas y sus principios activos por sus diversos efectos antimicrobianos (Scarpari *et al.*, 2017; Valdés *et al.*, 2017; Simonetti *et al.*, 2020; Bahaman *et al.*, 2021). Siendo las plantas del género *Agave* una de las que han mostrado actividad antibacteriana (Krishnaveni, 2017; López-Romero *et al.*, 2018; Camacho-Campo *et al.*, 2020); así también como la especie *Fouquieria splendens* (Rodríguez-Garza, 2010; Vega-Menchaca *et al.*, 2013). *Agave striata* es una especie endémica de México, y su distribución se encuentra en el Desierto Chihuahuense desde el estado de Hidalgo hasta Coahuila (Trejo *et al.*, 2016), por su parte *Fouquieria splendens* es la especie más distribuida de la familia Fouquieriaceae y se puede encontrar desde el suroeste de los Estados Unidos, y en México se encuentra en los desiertos de Chihuahua y Sonora, desde San Luis Potosí y Tamaulipas hasta la parte sur de Zacatecas, Querétaro e Hidalgo (Nevárez-Prado *et al.*, 2021). Los objetivos del presente trabajo son; determinar la presencia de fitoquímicos en los extractos metanólicos de las hojas de *A. striata* y de los tallos de *F. splendens*, y determinar su actividad antibacteriana *in vitro* e invernadero contra *Cmm* en tomate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de *Cmm*

La cepa de *Cmm* se obtuvo de plantas de tomate Saladette variedad Rio grande, de la zona productora de tomate del municipio de Ahome, en el Estado de Sinaloa. Se obtuvieron muestras de tallos y hojas con síntomas característicos de la enfermedad, ya que mostraban presencia de chancros en los tallos y marchitamiento marginal en los folíolos (Gartemann *et al.*, 2008), en el laboratorio de Micología y Biotecnología del Departamento de Parasitología de la UAAAN las muestras se desinfectaron con una solución de cloro al 3 % durante 3 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se dejó secar sobre papel estroza estéril. Una vez secas, las muestras se maceraron en bolsas de maceración con agua destilada estéril, posteriormente se tomó un tubo cónico con 9 mL de agua destilada

estéril y se le agregó 1 mL de líquido de la maceración de las muestras, de este se realizó una dilución de  $10^{-6}$ , y posteriormente se sembró en un medio King B (KB) y se re-aislaron las colonias con crecimiento similar al de *Cmm*, se eligieron las que presentaron las colonias amarillas, mucoides convexas, a las cepas aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas, propuestas por Shaad *et al.* (2001).

### Identificación molecular de *Cmm*

Se realizó la extracción de ADN de acuerdo con la metodología de Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones. Para la reacción de la PCR de punto final se utilizaron los primers marca Probiotek CMM5F (5'GCGAATAAGCCCATATCAA3') y CMM6R (5'CGTCAGGAGGTCGTAATA3') específicos para este patógeno, derivados del gen de patogenicidad pat-1 (serina proteasa) presente en el plásmido pCM2, cuyo tamaño de amplicón es de 614 pb aproximadamente (Dreier *et al.*, 1995). En la reacción de PCR se emplearon 7  $\mu$ L de Taq&GoT Mastermix (MB Biomedicals), 5  $\mu$ L de cada primer y 1  $\mu$ L de ADN. Las condiciones para realizar la amplificación requieren de una temperatura inicial de 95 °C durante 3 min, 94° por 30 seg, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y 72 °C por 5 min, con un total de 30 ciclos, en un termociclador MaxyGene (AxyGen, USA). Posteriormente se realizó la electroforesis mediante un buffer TBE 1X con un gel de agarosa al 1.2 %, para la visualización del gel se utilizó un fotodocumentador UVP.

### Colecta de plantas

Se colectaron plantas de *A. striata* y *F. splendens*, ubicadas en el municipio de General Cepeda, Coahuila, México (25°21'31.09"N y 101°27'54.91"O a 1525 m.s.n.m.), durante el mes de Mayo del 2021. Se depositaron en bolsas de estroza para su traslado al laboratorio de Micología y Biotecnología del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). En el laboratorio las plantas se lavaron con agua corriente, se secaron y se separaron las partes aéreas de las raíces. Posteriormente las partes aéreas de las plantas se colocaron en una estufa de secado (Arsa AR-130D, México) a 60 °C hasta presentar peso constante. Finalmente, cada planta se trituró con un molino (Surtek Mogra1, México), se pasaron por una licuadora (Mabe, México); finalmente se tamizaron con un tamiz de 0.2  $\mu$ m para guardarse en recipientes oscuros debidamente identificados hasta su uso.

### Preparación de los extractos

Los extractos se prepararon de acuerdo a el método reportado por Jasso de Rodríguez *et al.* (2015), con algunas modificaciones, utilizando como solvente metanol al 96 %; se depositaron 42 g del polvo de cada planta en matraces de 1L adicionando 750 mL del solvente; se colocaron en una parrilla de agitación (Thermo Scientific Cimarec, USA) durante 72 h a una temperatura de 60 °C. Posteriormente el solvente se separó mediante un rotavapor (IKA RV 10 digital V, USA) a 150 r.p.m a temperaturas de 70 °C. Una vez obtenida la fracción metanólica esta se vertió en recipientes de vidrio y se colocaron en una



estufa de secado (Arsa AR-130D, México) a 50 °C durante 48 h, finalmente se obtuvieron los extractos y se colocaron en frascos ámbar para su posterior uso.

### Análisis de compuestos fitoquímicos

Para la identificación de los compuestos fitoquímicos los extractos se prepararon a concentración de 1000 mg/L, y posteriormente se realizó el análisis de presencia de: alcaloides (Prueba de Dragendorf y Sonneschain); azúcares reductores (Prueba de Feling y Benedict); carbohidratos (Prueba de Molisch); carotenoides (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y FeCl<sub>3</sub>); cumarinas (Prueba de Erlich); esteroides y terpenos (Prueba de Liberman-Burchard y Rhosenthalert); flavonoides (Prueba de Shinoda y de NaOH); glicósidos cianogénicos (Prueba de Gringnard); purinas (Prueba de HCl); quinonas (Prueba de Hidróxido de amonio, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Borntrager); saponinas (Prueba de Espuma) y taninos (Prueba de Gelatina y FeCl<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) (Sahgal *et al.*, 2009; Usman *et al.*, 2009).

### Efectividad antibacteriana de los extractos metanólicos de plantas sobre *Cmm* *in vitro*

#### Ensayo *in vitro*

Se utilizó la metodología descrita por Tucuch-Pérez *et al.* (2020) mediante microplacas de poliestireno de 96 pozos; en ellas, la primera columna (testigo negativo) se le agregaron 110 µL de caldo nutritivo (medio) y 40 µL de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (revelador), a la segunda columna (testigo positivo) se le agregaron 100 µL de medio más 10 µL de suspensión bacteriana de *Cmm* a concentración de 1x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) UFC/mL y 40 µL de revelador, la tercera columna (testigo solvente) se preparó con 100 µL de medio y solvente (metanol) en una relación 1:1 (v/v) más 10 µL de suspensión bacteriana y 40 µL de revelador, a partir de la columna cuatro, se agregaron 100 µL del extracto a una concentración de 2000 mg/L, quedando en la columna cuatro a 1000 mg/L, se mezcló y se transfirieron 100 µL a la siguiente columna, así sucesivamente hasta la columna doce, obteniendo concentraciones de 1000 a 3.9 mg/L. El siguiente paso consistió en agregar 40 µL de revelador, y finalmente se adicionaron 10 µL de una suspensión bacteriana de *Cmm* a concentración de 1 x 10<sup>6</sup>. Cada microplaca se consideró una repetición con ocho unidades experimentales, y se realizaron tres repeticiones por tratamiento; se incubaron a 26 °C por 48 h y finalmente se realizó una lectura de absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific multiskan go 51119200, USA).

### Porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la fórmula propuesta por Arredondo-Valdés *et al.* (2021), donde:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = (1 - (As/Ac)) (100)$$

Ac: Absorbancia de la solución control.

As: Absorbancia de la solución muestra.

### Actividad biológica de los extractos metanólicos de *A. striata* y *F. splendens* contra *Cmm* bajo condiciones de invernadero

El experimento se llevó a cabo en el invernadero del Departamento de Parasitología (25°21'08.01"N y 101°01'38.00"O) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, durante el ciclo otoño-invierno de 2021.

### Inoculación y trasplante

Se utilizaron plantas de tomate variedad Rio Grande, con desarrollo de 25 días después de la siembra y con altura de 9 cm aproximadamente al momento del trasplante. Se prepararon vasos de unicel de 1L, y se les agregó 800 gramos de sustrato; el cual consistió de 45 % suelo (previamente pasteurizado), 45 % peat moss y 10 % perlita. Se realizaron heridas en la superficie de las primeras dos hojas verdaderas y el tallo con un hisopo estéril, posteriormente se asperjaron las heridas con una solución de 400 µL de *Cmm* a concentración de 1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, una vez inoculadas se dejaron reposar por 20 min, para después aplicar los tratamientos de los extractos de *F. splendens*, *A. striata* y el producto comercial Biobacter O°.

### Aplicación de los tratamientos

Los tratamientos utilizados fueron T1 = Testigo absoluto, T2 = Testigo inoculado, T3 = Extracto de hojas de *A. striata* (1828 mg/L), T4 = Extracto de tallos de *F. splendens* (1736 mg/L) y T5 = Testigo comercial (Biobacter O° 1 L/ha). En relación a los extractos vegetales la concentración utilizada se seleccionó tomando la Cl<sub>90</sub> del experimento *in vitro*. Estos se aplicaron por aspersión mediante bombas aspersoras de 3 L (J.H. Company 10344, USA). Se realizaron tres aplicaciones, la primera se realizó después de la inoculación de la bacteria; las otras aplicaciones se realizaron a los 7 y 14 d después de la primera aplicación, estas se realizaron directamente en la planta, en cada aplicación se asperjaron tres veces en la parte aérea y tres veces en la parte del tallo.

### Variables evaluadas

Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad, tanto en follaje como los tallos de las plantas. De igual forma, se evaluaron variables agronómicas, tales como: peso fresco y seco de la biomasa aérea y de la raíz, altura de planta, longitud de raíz y diámetro de tallo. La incidencia de la enfermedad se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia (I)} = \text{No. de plantas enfermas} / \text{Total de plantas} \times 100$$

La severidad se evaluó mediante la escala propuesta por Mohd Nadzir *et al.* (2019), la cual mide de un rango del 0 al 5 donde: 0 = Sin síntomas, 1 = 0 - 25 % de hojas marchitadas en la planta, 2 = 26 - 50 % de hojas marchitadas en la planta, 3 = 51 - 75 % de hojas marchitadas en la planta, 4 = 76 - 100 % de hojas marchitadas en la planta y 5 = Plantas muertas.

### Análisis estadístico

En el ensayo *in vitro* se realizó un análisis Probit para determinar la concentración inhibitoria al 50 % y al 90 % ( $Ci_{50}$  -  $Ci_{90}$ ) de cada extracto utilizando el programa estadístico Statistical AnalysisSys, V9.0., con los resultados obtenidos se realizó análisis de varianza con las concentraciones inhibitorias; en el estudio se evaluaron los tratamientos con tres repeticiones y se realizaron pruebas de rango de Duncan ( $p < 0.05$ ). Para el experimento bajo condiciones de invernadero se realizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Los datos de las variables evaluadas (incidencia, severidad y parámetros morfométricos) se sometieron a ANVA y pruebas de comparación de medias de Duncan ( $p < 0.05$ ), con el programa estadístico Statistical AnalysisSys, V9.0, cumpliéndose los supuestos de normalidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas preliminares para identificación de *Cmm*

A las cepas previamente aisladas de las muestras de las plantas de tomate con la posible presencia de *Cmm* se les realizaron pruebas bioquímicas, propuestas por Shaad *et al.* (2001), en donde la cepa denominada "CV1" mostro similitud con las reportadas para esta bacteria (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resultados de puebas bioquímicas correspondientes a la cepa "CV1".

**Table 1.** Results of biochemical tests corresponding to the "CV1" strain.

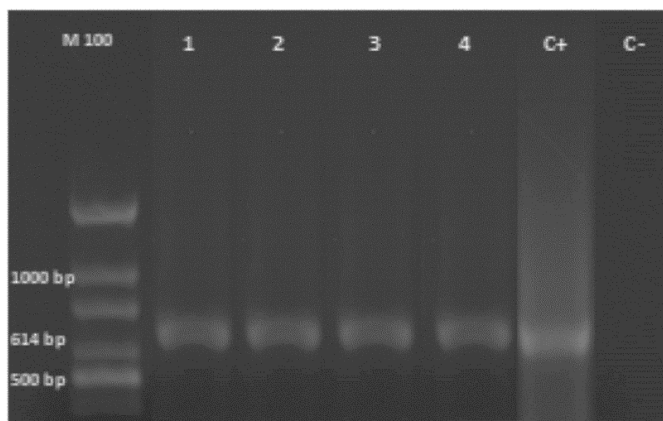
Prueba	Reacción "CV1"	Resultado
Crecimiento en B de King	+	+
Crecimiento a 28 °C	+	+
Colonias amarillas, mucoides y convexas	+	+
Tinción de Gram	+	+
Prueba de RYU	-	+
Oxidasa	-	+
Catalasa	+	+

### Identificación molecular de *Cmm*

Se confirmó que la cepa denominada "CV1" amplificó con los primers CMM5F/CMM6R específicos para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 1) mediante la técnica de PCR de punto final.

### Análisis de los Fitoquímicos identificados en *A. striata* y *F. splendens*

El extracto metanólico de *A. striata* presentó: alcaloides, carbohidratos, flavonoides (flavonones y chalconas), saponinas (triterpenoides y esteroidales), taninos (fenoles), quinonas (an-



**Figura 1.** Visualización del segmento de 614 bp. Carril "M" corresponde al marcador molecular de 10,000 bp; Carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a la misma cepa "CV1", aislada de las plantas de tomate colectadas con síntomas de *Cmm*; carril 5 corresponde a un control positivo (C+) (*Cmm*); y el carril 6 a un control negativo (C-) (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). \*Cepas control + (*Cmm*) y - (*Xcv*) obtenidas de la colección microbiológica del laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la UAAAN.

**Figure 1.** Visualization of the 614 bp segment. Lane "M" corresponds to the 10,000 bp molecular marker; Lanes 1, 2, 3 and 4 correspond to the same strain "CV1", isolated from tomato plants collected with *Cmm* symptoms; lane 5 corresponds to a positive control (C+) (*Cmm*); and lane 6 to a negative control (C-) (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). \*Control strains + (*Cmm*) and - (*Xcv*) obtained from the microbiological collection of the Phytopathology laboratory of the Department of Parasitology of UAAAN.

traquinonas y benzoquinonas), así como cumarinas (Tabla 2). Se han encontrado en *A. striata* presencia de flavonoles (derivados de quercetina) (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013), así como saponinas esteroidales (Marker y López, 1947). La presencia de saponinas esteroidales en el género *Agave* ha sido bien documentada (Scout y Eagleson, 1988) así los como compuestos alcaloides, flavonoides, terpenoides, cumarinas, azúcares reductores, inulina, fructanos, entre otros (Chigodi *et al.*, 2013; Almaraz-Abarca *et al.*, 2013). En las especies de *A. salmiana* y *A. fourcroydes* encontraron saponinas, flavonoides, alcaloides, taninos (Valdivia *et al.*, 2018; Delgado-Alvarado, 2021). Así también se han encontrado presencia de carbohidratos, azúcares reductores, quinonas y lactonas sesquiterpénicas en hojas de *A. Americana* (Cervantes-Tenorio y Reyna-Pizán, 2019), así como glucósidos cardiotónicos en *A. angustifolia* (Camacho-Campos *et al.*, 2020). Por su parte la especie *F. splendens* presentó: alcaloides, carbohidratos, flavonoides (flavonones, flavonas, flavononas y chalconas), azúcares reductores, saponinas (triterpenoides), taninos (derivados Acido

**Tabla 2.** Fitoquímicos identificados en extractos metanólicos.

**Table 2.** Phytochemicals identified in methanolic extracts.

	A		F			GC		AZ		S		T				Q			Cu	P	Ca
	F1	F2	F3	F4	Az1	Az2	S1	S2	T1	T2	T3	T4	Q1	Q2	Q3						
<i>A. striata</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	
<i>F. splendens</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	

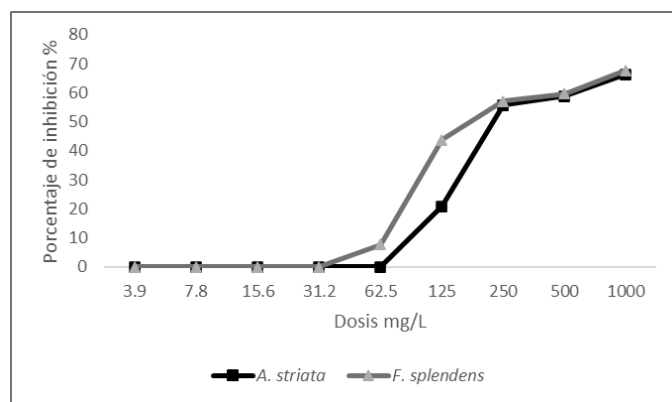
+ = Fitoquímico presente, - = Fitoquímico ausente; A = Alcaloides, C = Carbohidratos, F = Flavonoides, GC = Glucósidos Cianogenicos, AZ = Azúcares Reductores, S = Saponinas, T = Taninos, Q = Quinonas, Cu = Cumarinas, P = Purinas, Ca = Carotenoides, F1 = Flavonones, F2 = Flavonas, F3 = Flavononas, F4 = Chalconas, Az1 =, Az2, S1 = Triterpenoides, S2 = Esteroidal, T1 = Gelatina, T2 = Derivados Acido Gálico, T3 = Derivados Catecoles, T4 = Fenoles, Q1 = Antraquinonas, Q2 = Benzoquinonas, Q3 = Antronas.

Galico, derivados de catecol y fenoles) y quinonas (antraquinonas y benzoquinonas) (Tabla 2). Bate-Smith (1964), describe que los constituyentes más característicos del género *Fouquieria* corresponden a la flavonoides (leucocianidina, kaempferol y quercetina), ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido elágico, cumarina y escopoletina. Rodríguez-Garza (2010), encontró en *F. splendens* presencia de grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, esteroides y metilesteroides, cumarinas, saponinas, sesquiterpenlactonas y flavonoides. Dentro de la composición del ocotillo se descubrió que tanto los tallos como las hojas producían soluciones amarillas producto de varios flavonoides como el kaempferol, ermanina y cetina, además flavonas apigenina, acacetina, luteolina y crisoiol. Entre estos, apigenina y ermanina, rutina y quercetina-3-O-glucósido fueron los principales compuestos fenólicos en las hojas (Wollenweber, 1994; Monreal-García et al., 2019), también se han encontrado triterpenos, triterpenoides, saponinas esteroideas y compuestos iridoides (Takhtajan, 2009), y dentro de las flores los fitoesteroides y alcanos de cadena larga y corta; y en el tallo compuestos como el Dammaran-triterpeno, el fouquierol y el isofouquierol, así como el dammarendiol en las raíces (Hegnauer, 1989; Waterman, 1985). Por otro lado, en el ocotillo se ha aislado el pyxinol y el ocotillol, el último es una saponina triterpenoides el cual presenta actividades interesantes como la inhibición del crecimiento de bacterias con bajas tasas de toxicidad (Pokhilo y Uvarova, 1988; Bi Y. et al., 2017).

### Efectividad antibacteriana *in vitro*

Los extractos de las hojas de *A. striata* y de los tallos de *F. splendens* presentaron efecto inhibitorio en el crecimiento de *Cmm* (Figura 2 y Tabla 3), se observó que *A. striata* inhibió desde 125 mg/L y *F. splendens* desde 62.5 mg/L con 20.86 % y 7.69 % respectivamente, por su parte el análisis Probit estimó una  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  de 389.28 y 1828 mg/L para *A. striata*, y 308.82 y 1736 mg/L para *F. splendens* (Tabla 4).

No se encuentra en la literatura científica reportes sobre el efecto de extractos de *A. striata* y *F. splendens* en la inhibición de *Cmm*. El género *Agave* ya ha mostrado efecto bactericida con las



**Figura 2.** Inhibición de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* determinado por el método de microdilución en placa.

**Figure 2.** Inhibition of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by extracts of *Agave striata* and *Fouquieria splendens* determined by the plate microdilution method.

especies de *A. argentium*, *A. stricta*, *A. americana* y *A. angustifolia* los cuales mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli* que afectan la salud humana (Krishnaveni, 2017; López-Romero et al., 2018; Camacho-Campo et al., 2020). Así mismo la especie *F. splendens* ha mostrado efecto antibacteriano contra *S. aureus* y *E. coli* (Rodríguez-Garza, 2010; Vega-Menchaca et al., 2013), y contra *B. cereus*, *B. subtilis* (Rodríguez-Garza, 2010). Sin embargo la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Cmm* ya ha sido reportada por Arredondo-Valdés et al. (2020) con extractos etanólicos de hojas de *Magnolia tamaulipana* reportando una  $IC_{50}$  y  $IC_{90}$  de 64.75 – 176.73 ppm; además Arredondo-Valdés et al. (2021) utilizaron extractos etanólicos de hojas de *Moringa oleifera* contra *Cmm*, obteniendo una  $IC_{50}$  fue de 350.48 ppm. Pérez-Pérez et al. (2020) señalan que los extractos metanólicos, hexánico y de acetato de etilo a partir de raíces de *Jatropha dioica* Seseé (Sangre de drago), también inhibieron el crecimiento de *Cmm*, con una mejor respuesta con acetato de etilo con una  $CI_{50}$  de  $2.0 \pm 0.43$  mg mL<sup>-1</sup>. De igual manera se reportan con los extractos metanólicos de hojas de *Calendula officinalis* y *Echinacea purpurea* actividad inhibitoria contra *Cmm* (Aksoy et al., 2021).

### Efectividad biológica de los extractos metanólicos de *A. striata* y *F. splendens* contra *Cmm* en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero

#### Incidencia y severidad de la enfermedad

Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, a excepción del tratamiento con *F. splendens* contra el tratamiento inoculado. Siendo la incidencia de *F. splendens* 25 %, *A. striata* y Biobacter 50 % y el testigo inoculado 100 %. (Tabla, 5). Por su parte, la severidad no mostró diferencias significativas entre tratamientos, a excepción del testigo inoculado el cual presentó una severidad de 3.25, siendo superior a la presentada por los tratamientos aplicados, los cuales mostraron una severidad de 1, 0.5 y 0.25 en el caso de *A. striata*, *F. splendens* y Biobacter. El efecto obtenido sobre la disminución de la enfermedad de *Cmm* en las plantas tratadas puede ser debido a que los extractos de *A. striata* y *F. splendens* presentaron fitoquímicos tales como: alcaloides, carbohidratos, flavonoides, saponinas, taninos, quinonas, cumarinas, sin embargo *F. splendens* también presentó azúcares reductores y mayor presencia de taninos. Dichos compuestos presentan actividad antibacteriana al degradar y alterar la pared celular, inhiben la actividad enzimática e inactiva tóxicos de origen microbiano (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Ávalos y Pérez, 2009; Andrade-Bustamante et al., 2017). La presencia de taninos hidrolizables, en su mayoría elagitaninos y galotananos (precursores del ácido gálico) han mostrado efectividad antibacteriana, pues tienen la capacidad de formar enlaces con glicoproteínas presentes en las membranas bacterianas, causando inestabilidad e inhibición a varias funciones vitales de los microorganismos, como: protección celular, transporte de nutrientes o proteínas y obtención de energía (Rosero-Ortiz, 2021), estos se encuentran presentes en los extractos de *F. splendens*, debido a esto pudo haber sido mayor la eficacia en el control de *F. splendens* contra *Cmm*.



**Tabla 3:** Porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones de los extractos metanólicos de hojas de *Agave striata* y tallos de *Fouquieria splendens*.**Table 3:** Inhibition percentage of the different concentrations of methanolic extracts from leaves of *Agave striata* and stems of *Fouquieria splendens*.

Tratamientos	1000 mg/L	500 mg/L	250 mg/L	125 mg/L	62.5 mg/L	31.2 - 3.9 mg/L
A. striata	66.34	58.89	55.81	20.86	0	0
F. splendens	67.74	59.67	57.10	43.82	7.69	0

**Tabla 4.** Valores de las concentraciones inhibitorias al 50 y 90 % ( $Ci_{50}$  y  $Ci_{90}$ ) de los extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* In Vitro.**Table 4.** Inhibitory concentration at 50 and 90 % ( $Ic_{50}$  and  $Ic_{90}$ ) of *Agave striata* and *Fouquieria splendens* extracts on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* In Vitro.

Tratamientos	$Ci_{50}$	$Ci_{90}$
A. striata	389.28 mg/L	1828 mg/L
F. splendens	308.82 mg/L	1736 mg/L

**Tabla 5:** Incidencia y Severidad en follaje de plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y tratadas con extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens*.**Table 5:** Incidence and Severity in tomato plants foliage inoculated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and treated with *Agave striata* and *Fouquieria splendens* extracts.

Tratamientos	Incidencia	Severidad
1. Tratamiento Absoluto	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2. Tratamiento Inoculado	100 <sup>b</sup>	3.25 <sup>b</sup>
3. Tratamiento con extracto de A. striata	50 <sup>ab</sup>	1.00 <sup>a</sup>
4. Tratamiento con extracto de F. splendens	25 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>
5. Tratamiento producto comercial "Biobacter O"	50 <sup>ab</sup>	50 <sup>a</sup>

\*Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Duncan,  $p < 0.05$ ).

### Parámetros morfométricos evaluados

Los resultados obtenidos en los parámetros morfométricos evaluados (Tabla 6), muestran que los tratamientos (*A. striata*, *F. splendens* y Biobacter) mostraron similitud estadística con el testigo absoluto en diámetro de tallo, para altura de planta *F. splendens* y Biobacter mostraron relación estadística con el testigo absoluto, para tamaño de raíz los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos, y solo *F. splendens* mostró similitud con el testigo absoluto, para peso fresco tampoco se observaron diferencias entre los tratamientos y solo Biobacter mostró similitud con el testigo absoluto, para el peso seco el mejor tratamiento fue Biobacter el cual se separó estadísticamente de los tratamientos de *A. striata* y *F. splendens*, esto se puede entender ya que el producto Biobacter en su formulación orgánica además de extractos vegetales, por esporas de bacterias bioestimuladoras de *Bacillus* spp. Por su parte *F. splendens* mostro similitud estadística en diámetro de tallo, altura de planta y tamaño de raíz con el testigo absoluto, lo que podría indicar que este extractos pudiera tener acción bioestimuladora de crecimiento en las plantas tratadas.

**Tabla 6:** Parámetros morfométricos de plantas inoculadas de tomate con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, y tratadas con extractos de *Agave striata* y *Fouquieria splendens* bajo condiciones de invernadero.**Table 6:** Morphometric parameters of tomato plants inoculated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, treated with *Agave striata* and *Fouquieria splendens* extracts under greenhouse conditions.

Tratamientos	Diámetro de tallo (mm)	Altura de tallo (cm)	Tamaño de raíz (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Absoluto	4.06 ± 0.73 <sup>a</sup>	13.8 ± 1.18 <sup>a</sup>	6.55 ± 0.91 <sup>a</sup>	3.86 ± 0.57 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.08 <sup>a</sup>
Inoculado	2.78 ± 0.27 <sup>c</sup>	6.3 ± 0.91 <sup>c</sup>	3.92 ± 0.62 <sup>c</sup>	2.06 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>d</sup>
A. striata	3.54 ± 0.23 <sup>ab</sup>	9.25 ± 1.08 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.32 <sup>b</sup>	2.39 ± 0.51 <sup>bc</sup>	0.26 ± 0.03 <sup>c</sup>
F. splendens	3.78 ± 0.17 <sup>ab</sup>	12.9 ± 0.56 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.75 <sup>ab</sup>	2.81 ± 0.19 <sup>bc</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>c</sup>
5. Biobacter	3.18 ± 0.14 <sup>ab</sup>	11.4 ± 1.80 <sup>a</sup>	5.57 ± 0.25 <sup>b</sup>	3.24 ± 0.97 <sup>ab</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>b</sup>

\*Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Duncan,  $p < 0.05$ ).

### CONCLUSIONES

Los compuestos fitoquímicos determinados en los extractos metanólicos de *A. striata* y *F. splendens* pertenecen a las familias de los alcaloides, carbohidratos, flavonoides, saponinas, taninos, quinonas, cumarinas, sin embargo, *F. splendens* tuvo mayor presencia de taninos, flavonoides y preceñica de azúcares reductores. En el ensayo *in vitro* ambos extractos mostraron actividad antibacteriana sobre *Cmm*, sin embargo, en el experimento bajo condiciones de invernadero el extracto de *F. splendens* mostró mayor reducción en la incidencia y severidad, seguido de Biobacter, y por último el extracto de *A. striata*. En cuanto a los parámetros morfométricos los tratamientos con mayor efectividad biológica contra *Cmm* fueron Biobacter y *F. splendens*. Los resultados muestran que la presencia de fitoquímicos en los extractos puede estar relacionado con la eficiencia en el control de *Cmm*, ya que *F. splendens* presento mayor número de fitoquímicos que *A. striata*.

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el proyecto de asignación 2020-000026-02NACF-17358, y a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro con clave 38111-425101001-2455.

### REFERENCIAS

Aksoy, H.M., Arslanoğlu, Ş.F., Edbeib, M.F., Kaya, Y. y Marakli, S. 2021. Actividad antibacteriana de los extractos de *Calendula officinalis* y *Echinacea purpurea* contra el agente causal del cancro bacteriano del tomate: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 20: 496-502.

- Almaraz-Abarca, N., González-Elizondo, M., Campos, M., Ávila-Sevilla, Z.E., Delgado Alvarado, E.A. y Ávila-Reyes, J.A. 2013. Variability of the foliar felon profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). *Botanical Sciences*. 91(3): 295-306.
- Alvarez, A.M., Kaneshiro, W.S. y Vine, B. G. 2004. Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in tomato seed: What is the significance. *Acta Horticulturae*. 695:205-214.
- Andrade-Bustamante, G., García-López, A.M., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzim, C.E., Borboa-Flores, J. y Rueda-Puente, E.O. 2017. Estudio del potencial biocontrolador de las plantas autóctonas de la zona árida del noroeste de México: control de fitopatógenos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 49(1): 127-142.
- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M., y Teraoka, T. 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*. 24(1): 135-147.
- Arredondo-Valdés, R., Chacón-Hernández, J.C., Reyes-Zepeda, F., Hernández-Castillo, F.D., Anguiano-Cabello, J.C., Heinz-Castro T.Q., Mora-Ravelo S.G. 2020. *In vitro* antibacterial activity of *Magnolia tamaulipana* against tomato phytopathogenic bacteria. *Plant Protection Science*. 56(4): 268-274.
- Arredondo-Valdés, R., Hernández-Castillo, F.D., Rocandio-Rodríguez, M., Anguiano-Cabello, J.C., Rosas-Mejía, M., Vanoye-Eligio, V., Ordaz-Silva, S., López-Sánchez, I.V., Carrascosa-Peña, L.D. y Chacón-Hernández, J.C. 2021. *In vitro* Antibacterial Activity of *Moringa oleifera* Ethanolic Extract against Tomato Phytopathogenic Bacteria. *Phyton*. 90(3): 1299.
- Ávalos, G.A. y Pérez-Urria, C.E. 2009. Serie Fisiología Vegetal. *Reduca Biología*. 2(3): 119-145.
- Balestra, G.M., Heydari, A., Ceccarelli, D., Ovidi, E. y Quattrucci, A. 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*. 28: 807-811.
- Bahaman, A.H., Wahab, R.A., Abdul Hamid, A.A., Abd Halim, K.B. y Kaya, Y. 2021. Molecular docking and molecular dynamics simulations studies on  $\beta$ -glucosidase and xylanase *Trichoderma asperellum* to predict degradation order of cellulosic components in oil palm leaves for nanocellulose preparation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 39(7): 2628-2641.
- Basim, H., Yegen, O. y Zeller, W. 2000. Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria/Die antibakterielle Wirkung des ätherischen Öls von *Thymbra spicata* L. var. *spicata* auf phytopathogene Bakterien. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*. 279(3):279-284.
- Bate-Smith, E.C. 1964. Chemistry and taxonomy of *Fouquieria splendens* Engelm.: A new member of the asperuloside group. *Phytochemistry*. 3(5):623-625.
- Bi, Y., Liu, X.X., Zhang, H.Y., Yang, X., Liu Z.Y., Lu J., Lewis, P.J., Wang, Ch.Z., Xu, J.Y., Meng, Q.G., Ma, K. y Yuan, Ch.S. 2017. Synthesis and antibacterial evaluation of novel 3-substituted ocotillol-type derivatives as leads. *Molecules*. 22(4):1-10.
- Calleros, G.V. 2013. Manejo y Control de las Enfermedades Bacterianas en Productos Agrícolas. XL Congreso Nacional y XV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31: 74-75.
- Camacho-Campos, C., Pérez-Hernández, Y., Valdivia-Ávila, A., Rubio-Fontanills, Y. y Fuentes-Alfonso, L. 2020. Evaluación fitoquímica, antibacteriana y moluscicida de extractos de hojas de *Agave* spp. *Revista Cubana de Química*. 32(3): 390-405.
- Cervantes-Tenorio, R.M. y Reyna-Pizán, T.N. 2019. Identificación fitoquímica y aislamiento de microorganismos endófitos de *Agave americana*. Universidad María Auxiliadora. Lima, Perú. 21-23 pp.
- Chigodi, M.O., Samoei, D.K. y Muthangya, M. 2013. Phytochemical screening of *Agave sisalana* Perrinele aves (waste). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 4(4): 200-204.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., JrVidaver, A.K. y Harris, R.W. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov. subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 34: 107-117.
- De León, L., Sivero, F., López, M. Y Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seed born tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. *Plant Diseases*. 95(11): 1328-1339.
- Delgado-Alvarado, E.A., Ávila-Reyes, J.A., Torres-Ricario, R., Naranjo-Jiménez, N., Chaidez-Ayala, A.I. y Almaraz-Abarca, N. 2021. Caracterización fitoquímica de *Agave shrevei* Gentry. *e-CUCBA*. (16): 56-59.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Dreier, J., Bempohl, A. y Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*. 85:462-468.
- EFSA (2014). Scientific opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* *EFSA Journal*. 12(6): 1-26.
- Fatmi, M. y Schaad, N.W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*. 51:149-154.
- FAO [Consultado 12 Marzo 2022] 2020. FAOSTAT. Disponible en: <http://www.fao.org/foostat/es/#home/>.
- FAOSTAT [Consultado 13 Marzo 2022] 2020. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estadísticas. Disponible En: <http://www.fao.org/foostat/es/#home>.
- FIRA. 2016. Panorama Agroalimentario: Tomate rojo. *Panorama Agroalimentario*. 2-10 pp.
- Gartemann, K.H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. y Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*. 106: 179-191.
- Gartemann, K.H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., MacHardy, A., Meyer, F., Pohlé, S., Ruckert, C., Schneiker, S., Zellermann, E.M., Puhler, A. y Eichenlaub, R. 2008. The genome sequence of the tomatopathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of Bacteriology*. 190: 2138-2149.
- Hadas, R.G., Kritsman, Klietman F., Gefen, T. y Manulis, S. 2014. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant pathology*. 54: 643-649.

- Hegnauer, R. 1989. Chemotaxonomie Der Pflanzen. In an overview of the distribution and the systematic importance of plant substances. Birkhäuser-Verlag, Basel. 8: 684-689.
- Jasso de Rodríguez, D., Trejo-González, F.A., Rodríguez-García, R., Díaz-Jimenez, M.L.V., Sáenz-Galindo, A., Hernández-Castillo, F.D., Villarreal-Quintanilla, J.A. y Peña-Ramos F.M. 2015. Antifungal activity *in vitro* of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Industrial Crops and Products. 75: 150-158.
- Kawaguchi, A., Tanina, K. y Inoue, K. 2010. Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. Plant Pathology. 59: 76-83.
- Koike, S.T., Gladders, P. y Paulos, A.O. 2007. Vegetables Diseases. London, U.K: Manson Publishing. 320 pp.
- Krishnaveni, V. 2017. Investigation of phytochemical and antibacterial activity on *Agave americana* methanolic extract for medical applications. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 8(3): 500-505.
- López, M.L.M. 2017. Manual técnico del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*). San José, Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria. 76-80 pp.
- López-Romero, J.C., Ayala-Zavala, J.F., Peña-Ramos, E.A., Hernández, J. y González-Ríos, H. 2018. Antioxidant and antimicrobial activity of *Agave angustifolia* extract on overall quality and shelf life of pork patties stored under refrigeration. Journal of Food Science and Technology. 55(11): 4413-4423.
- Marker, R.E. y López, J. 1947. Sapogeninas esteroides. Nº 162. Kappogenina y Furcogenina. Journal of American Society. 69(10): 2380-2383.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanovic, E. y Stepanovic, M. 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. Pesticide and Phytomedicine. 24: 19-27.
- Mohd-Nadzir, M.M., Vieira-Lelis, F.M., Thapa, B., Ali, A., Visser, R.G.F., Van-Heusden, A.W. y van der Wolf, J.M. 2019. Development of an *in vitro* protocol to screen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pathogenicity in different *Solanum* species. Plant pathology. 68(1): 42-48.
- Monreal-García, H., Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes J., Torres-Ricario R., González-Elizondo S., Herrera-Arrieta Y. y Gutiérrez-Velázquez M.V. 2019. Phytochemical variation among populations of *Fouquieria splendens* (Fouquieriaceae). Botanical Science. 97(3): 398-412.
- Nandi, M., MacDonald, J., Liu, P., Weselowski, B. y Yuan, Z.C. 2018. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: cancro bacteriano del tomate, interacciones moleculares y manejo de enfermedades. Patología de las Plantas Moleculares. 19(8): 1-47.
- Nevárez-Prado, L.O., Rocha-Gutiérrez, B.A., Néder-Suárez, D., Córdova-Lozoya, M.T., Ayala-Soto, J.G., Salazar-Balderrama, M.I., Ruiz-Anchondo, T.J. y Hernandez-Ochoa, L.R. 2021. El género *Fouquieria*: una revisión de aspectos etnobotánicos, fitoquímica y actividad biológica. Tecnociencia, Chihuahua. 15(3): 186-220.
- Pérez-Pérez, J.U., Guerra-Ramírez, D., Reyes-Trejo, B., Cuevas-Sánchez, J.A. y Guerra-Ramírez, P. 2020. Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de *Jatropha dioica* Seseé contra bacterias fitopatógenas de tomate. Polibotánica. (49): 125-133.
- Pokhilo, N.D. y Uvarova, N.I. 1988. Isoprenoids of various species of the genus *Betula*. Chemistry of Natural Compounds. 24(3): 273-285.
- Rodríguez-Garza, R.G. 2010. Tamizaje fitoquímico y actividad biológica de *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma De Nuevo León. Nuevo León, México, 32-35 pp.
- Rosero-Ortiz, J.N. 2021. Revisión actualizada sobre las actividades farmacológicas y aplicaciones de los taninos. Facultad de Ciencias Químicas. Quito, Ecuador. 29-35 pp.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M. N., Ismail, S. y Mansor, S. M. 2009. Phytochemical and antimicrobial activity of *Swietenia mahagoni* crude methanolic seed extract. Tropical Biomedicine. 26(3): 274-279.
- Sarwar, M. 2015. Biopesticides: an effective and environmental friendly insect-pests inhibitor line of action. International Journal of Engineering and Advanced Research Technology. 1(2): 10-15.
- Scarpari, M., Reverberi, M., Parroni, A., Scala, V., Fanelli, C., Pietricola, C., Zjalic, S., Maresca, V., Tafuri, A., Ricciardi, M. R., Liccheta, R., Mirabilii, S., Sveronis, A., Cescutti, P. y Rizo, R. 2017. Tramesan, a novel polysaccharide from *Trametes versicolor*. Structural characterization and biological effects. Plos One. 12(8): e0171412.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. y Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St Paul, Minnesota, USA. APS Press.
- Sen, Y., Van der Wolf, J., Visser, R.G.F. y Van Heusden, S. 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. Plant Disease 99(1): 4-13.
- Sen, Y., Aysan, Y., Mirik, M., Ozdemir, D., Meijer-Dekens, F., van der Wolf, J.M., Visser, R. G.F. y Van Heusden S. 2018. Genetic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Turkey. Plant Disease. 102: 300-308.
- Scout, T. y Eagleson, M. 1988. Enciclopedia Concisa de Bioquímica. 2da. Ed. Acriba. España. 712 p.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoin, H. y Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de metabolitos secundarios en la defensa de plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 21(3): 354-363.
- Simonetti, G., Pucci, N., Brasili, E., Valletta, A., Sammarco, I., Carnevale, E., Pasqua G. y Loreti, S. 2020. In vitro antimicrobial activity of plant extracts against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae causal agent of bacterial canker in kiwifruit. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 154(1): 100-106.
- Takhtajan, A. (Ed.) 2009. Class Magnoliopsida (Dicotyledons). Flowering Plants. Springer. Amsterdam, Netherlands. 7-588.
- Tíreng-Karut, S., Horuz, S. y Aysan, Y. 2019. Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı etmeni *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*' in tohumda aranması ve tohum uygulamalarının patojen gelişimine etkisinin belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 16(3): 284-296.
- Trejo, L., Alvarado-Cárdenas, L.O., Scheinvar, E. y Eguiarte, L.E. 2016. Population genetic analysis and bioclimatic modeling in *Agave striata* in the Chihuahuan Desert indicate higher genetic variation and lower differentiation in drier and more variable environments. American journal of botany. 103(6): 1020-1029.
- Tucuch-Pérez, M.A., Arredondo-Valdés, R. y Hernández-Castillo, F.D. 2020. Antifungal activity of phytochemical compounds of extracts from Mexican semi-desert plants against *Fusarium oxysporum* from tomato by microdilution in plate method. Nova Scientia. 12(25): 1-19.



- Usman, H., Abdulrahman F.I. y Usman A. 2009. Qualitative phytochemical screening and *in vitro* antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficus thonningii* (Moraceae). African Journal Traditional Alternative Medicine. 6(3): 289-295.
- Valdés, R.A., Castillo, F.D.H., Cabello, J.C.A., Fuentes, Y.M.O., Morales, G.G., Cantú, D.J. y Aguilar, C.N. 2017. Review of antibacterial activity of plant extracts and growth-promoting microorganism (GPM) against phytopathogenic bacterial tomato crop. European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering. 4(1): 11-27.
- Valdivia, A.L., Fontanills, Y.R., Álvarez, L.M.H., Rabelo, J.J., Hernández, Y.P. y Tundidor, Y. P. 2018. Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de los extractos de las hojas de *Agave fourcroydes* Lem.(henequén). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 23(2): 1-3.
- Vega-Menchaca, M.C., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., Rubio-Morales, M.E., Núñez-González, M.A. y Serrano-Gallardo, L.B. 2013. Antimicrobial activity of five plants from Northern Mexico on medically important bacteria. African Journal of Microbiology Research. 7(43): 5011-5017.
- Waterman, P.D. 1985. Triterpenes from the stem bark of *Commiphora dalzielii*. Phytochemistry. 23(12): 2925-2928.
- Wollenweber, E. 1994. External Flavonoids of Ocotillo (*Fouquieria splendens*). Journal of Biosciences. 689-690.
- Xu, X., Miller, F., Baysal-Gurel, K., Gartemann, R., Eichenlaub, K. y Rajashekara, G. 2010. Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection in tomato seeds and plants. Applied Environmental Microbiology. 76: 3978-3988.

# Physicochemical, techno-functional and antioxidant characterization of coffee silverskin

Caracterización fisicoquímica, tecno-funcional y antioxidante de la piel plateada del café

Rey David Vargas-Sánchez, Brisa del Mar Torres-Martínez, Gastón Ramón Torrescano-Urrutia, Armida Sánchez-Escalante\*

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA). Laboratorio de Investigación en Carne y Productos Cárnicos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas #46, Hermosillo 83304, Sonora, México.

## ABSTRACT

Coffee residues have been considered a valuable source of nutritional and functional components, thus are considered as a potential ingredient for foods. The aim of this study was to evaluate the physicochemical, techno-functional, and antioxidant properties of coffee silverskin flakes and powder. The results indicated that coffee silverskin flakes and powder showed pH near to neutrality, and the color was Roman coffee and Deep coffee, respectively, which show that milling process change this parameter. Coffee silverskin flakes showed the highest water and oil-holding capacity, while both coffee residues exert slight swelling and foam capacity, and foam stability, without effect of milling process. However, both residues do not exert emulsion and gelling capacity, as well as emulsion stability. The presence of phenols, flavonoids, caffeoylquinic acid and alkaloids (powder > flakes) were detected in both residues, which exert free- and radical-cation scavenging activity (powder = flakes), reducing power properties, and lipid oxidation inhibition (powder > flakes). In conclusion, coffee silverskin can be proposed as a functional ingredient for food industry.

**Keywords:** coffee residues, chemical compounds, physicochemical properties, techno-functional properties, antioxidant.

## RESUMEN

Los residuos de café se han considerado una fuente valiosa de componentes nutricionales y funcionales, por ello se consideran un ingrediente potencial para la industria alimentaria. El objetivo del estudio fue evaluar las propiedades fisicoquímicas, tecno-funcionales y antioxidantes de hojuelas y harina de la piel plateada de café. Las hojuelas y la harina de piel plateada de café mostraron un pH cercano a la neutralidad, y el color fue café romano y café profundo, respectivamente, lo que indica que el proceso de molienda cambia este parámetro. Los resultados indicaron que las hojuelas de cascarilla de café mostraron la mayor capacidad de retención de agua y aceite, mientras que ambos residuos presentaron ligera capacidad de hinchamiento, formación de espuma y estabilidad de espuma, sin efecto del proceso de molienda. Sin embargo, ambos residuos no presentaron

capacidad de emulsión y gelificación, así como estabilidad de la emulsión. La presencia de fenoles, flavonoides, ácido cafeoilquinico y alcaloides (harina > hojuelas) fue detectada en ambos residuos, los cuales ejercieron actividad contra radicales libres y cationes (harina = hojuelas), poder reductor e inhibición de oxidación de lípidos (harina > hojuelas). En conclusión, la cascarilla de café puede proponerse como ingrediente funcional para la industria alimentaria.

**Palabras clave:** residuos de café, compuestos químicos, propiedades fisicoquímicas, propiedades tecno-funcionales, antioxidante.

## INTRODUCTION

In Mexico, processed food production represented 22.5 % of the manufacturing GDP (gross domestic product) and 3.6 % of total GDP in 2018, mainly bakery products followed by the meat sector (CDRSSA, 2019). Regarding meat products, poultry is the most popular meat used in their formulation (51 % of total production), especially destined to produce hams and sausages. Meat products formulated with red meats (22 % of total production) were represented by hams, including cooked, American, Virginia, smoked, baked, and York. Cold meats represented 27 % of total production, including sausages, chorizo, bacon, mortadella, and others. Additionally, the average domestic consumption of meat products was 0.7 kg in the last five years (COMECARNE, 2021).

Moreover, intrinsic and extrinsic factors may adversely affect food quality and shelf life in terms of lipid oxidation, during formulation, transportation, and storage period. Consequently, lipid oxidation results in negative effects on physicochemical and functional properties. Thus, food additives have been widely used in the meat industry to improve nutrimental, sensory, and functional properties (Oswell *et al.*, 2018; Domínguez *et al.*, 2019).

A food additive is any substance used directly or indirectly in the production, processing, treatment, packaging, transport, or storage, becomes a component, or otherwise affects the characteristics of any food. However, these substances may be given to a testing and approval process to be generally recognized as safe or GRAS (USDA, 2021). Although consumer feelings on synthetic additives have been discus-

\*Autores para correspondencia: Armida Sánchez-Escalante  
 Correo electrónico: armida-sanchez@ciad.mx

Recibido: 13 de mayo de 2022

Aceptado: 28 de agosto de 2022

sed, meat processors have used natural ingredients to improve technological requirements and increase consumer's expectations (Balestra and Petracci, 2019).

In this context, it has been proved that coffee residues (husk, pulp, silverskin, and spent coffee grounds) are an important source of nutritional and functional components. Thus, spent coffee grounds powder and extracts have been used as functional ingredients for minced pork and chicken meat to reduce the oxidation process (Jully *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016). Also, it has been reported that coffee husk powder improves physicochemical (pH and color), techno-functional (cooking loss), and oxidative stability (lipid oxidation) in raw and cooked pork patties (Martuscelli *et al.*, 2021a). However, data on coffee residues' physicochemical and functional properties as natural additives are still limited.

Therefore, this work aimed to evaluate coffee silverskin's physicochemical, techno-functional, and antioxidant properties.

## MATERIALS AND METHODS

### Coffee residues processing

A commercial supplier (CAFFENIO®) in Hermosillo, Mexico, donated coffee silverskin flakes from dark *Coffea arabica* L. To obtain the powder, coffee silverskin flakes were pulverized at 20 mesh of particle size (hammer mill, Pulvex 200, DF, Mexico). Both materials were packed under vacuum (vacuum sealer, Food Saver®, FLA., USA) and stored at room temperature (25 °C) until analysis.

### Physicochemical characterization

#### Measurement of pH

The pH of coffee residues and the commercial standard was measured after homogenization with distilled water at a 1:10 ratio with a potentiometer (pH211, Hanna Instruments Inc., RI, USA) with automatic temperature control (AOAC, 2020).

#### Color measurement

The color measurement was performed using a spectrophotometer (CM-508d, Konica Minolta Inc., TYO, Japan). The registered values were lightness ( $L^*$ , ranging from 0-black to 100-white), redness ( $a^*$ , takes positive values for reddish colors and negative values for greenish colors), yellowness ( $b^*$ , takes positive for yellowish colors and negative for bluish colors), Chroma ( $C^*$ ), and hue angle ( $h^*$ ). The coffee residues were placed in 3.5 cm diameter Petri dishes, and ten measurements were performed on the samples surface (Robertson *et al.*, 1977).

### Techno-functional characterization

The techno-functional properties of coffee residues and commercial standard were measured as previously described with slight modifications (Haque *et al.*, 2020; López-Marcos *et al.*, 2015).

### Water-holding capacity (WHC)

Samples (0.1 g) were homogenized with 1.5 mL of distilled water at 10,000 rpm for 1 min, and kept at 25 °C for 30 min. Subsequently, the test tubes were centrifuged at 15,000 x g for 20 min at 4 °C. The supernatant was decanted, and the test tubes with the sediments were weighed. The WHC (%) was calculated as [(Final weigh of the tube with the sample – Initial weigh of the tube with the sample) / (Weigh of the sample)] x 100.

### Oil-holding capacity (OHC)

Samples (0.1 g) were homogenized with 1.5 mL of commercial corn oil at 10,000 rpm for 1 min, and kept at 25 °C for 30 min. Subsequently, the test tubes were centrifuged at 15,000 x g for 20 min at 4 °C. The supernatant was decanted, and the test tubes with the sediments were weighed. The OHC (%) was calculated as [(Final weigh of the tube with the sample – Initial weigh of the tube with the sample) / (Weigh of the sample)] x 100.

### Swelling capacity (SC)

Samples (0.5 g) were homogenized with 5 mL of distilled water at 10,000 rpm for 1 min, using a graduated tube, and kept at 25 °C for 1 h. The initial and final volume occupied by the samples was measured, and the increase in sample volume after incubation indicates SC.

### Foaming capacity (FC)

Samples (0.5 g) were homogenized with 10 mL of distilled water at 5,000 rpm for 5 min at 4 °C (Ultraturrax T25, IKA, Stau, Germany). The foam produced within 30 sec, shows FC.

### Foaming stability (FS)

The volume of the foam initially produced was measured within 30 sec, and test tubes were incubated at 25 °C for 30 min. Then, the volume of the foam was measured, and a reduction in the volume showed the absence of FS.

### Emulsion capacity (EC)

Samples (0.5 g) were homogenized with 10 mL of distilled water at 8,000 rpm for 1 min at 4 °C. The resultant solution was homogenized with 10 mL of commercial corn oil, under the same conditions. A two-phase suspension formation shows EC.

### Emulsion stability (ES)

The previously prepared emulsion was heated for 30 min at 80 °C, cooled at 25 °C, and centrifuged at 12,000 x g for 5 min at 4 °C. If the first emulsion is not broken, it indicates ES.

### Gelling capacity (GC)

The coffee residues were homogenized with distilled water to obtain several suspensions at 0, 2.5, 5, 10, 15, and 20 % (w/v) and boiled for 1 h. Subsequently, test tubes were cooled for 1 h at 0 °C. The tubes were inverted to see gel formation.



**Antioxidant activity****Phytochemical profile**

The qualitative phytochemical analysis of coffee residues was conducted according to standard methods (Griffiths *et al.*, 1992; Samejo *et al.*, 2011; Samejo *et al.*, 2013). Texturized soy protein was used as a commercial standard. A total of 0.5 g of coffee residues and the commercial standard were homogenized with 10 mL of distilled water at 10,000 rpm for 1 min (vortex mixer, Fisher Scientific™, CA, USA) and filtered (Whatman 1 filter paper) to extract phytochemicals (stock solution). In flavonoids and steroids analysis, methanol and  $\text{CHCl}_3$  were used as solvent extraction, respectively. In addition, phenols, flavonoids and caffeoylquinic acid profile were determined by the ferric chloride, Shinoda and sodium nitrite tests, respectively. While, alkaloids, terpenoids, steroids and saponins were evaluated by the Dragendorff's, Salkowski, Lieberman-Burchard and foam tests, respectively.

**Phytochemical content**

The quantitative phytochemical analysis of the coffee residues and the commercial standard was also conducted. In brief, the compounds were extracted using an aqueous solution as solvent (1:10, solid-solvent ratio) by ultrasound-assisted method at 42 KHz for 30 min at 25 °C (Bransonic 3800, Ultrasonics Corp., Jeju, Korea). The resultant solution was filtered (Whatman No. 4 filter paper), concentrated under reduced pressure at 60 °C (rotary evaporator Yamato RE-301BW, Tokyo, Japan) and dried (Freeze dryer Yamato DC401, Tokyo, Japan). The obtained extracts were stored at -20 °C in the dark until analysis.

Total phenolic content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu method (Ainsworth and Gillespie, 2007). An aliquot of each extract (20 µL, 5 mg/mL) was homogenized with 80 µL of distilled water, 60 µL of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7 %, w/v), and 40 µL of Folin-Ciocalteu's reagent (0.25 N). The resultant solution was mixed with 80 µL of distilled water and incubated for 1 h at 25 °C, in the dark. The absorbance was measured at 750 nm in a spectrophotometer (Multiskan FC UV-Vis, Thermo Scientific, Tokyo, Japan), and results were expressed as mg equivalents of gallic acid per g of dried extract (mg GAE/g).

Total flavonoids content (TFC) was evaluated by the aluminum chloride-complex formation method (Popova *et al.*, 2004). An aliquot of each extract (20 µL, 5 mg/mL) was homogenized with 130 µL of methanol and 20 µL of  $\text{AlCl}_3$  (5 %, w/v). The resultant mixture was incubated for 30 min at 25 °C, in the dark. The absorbance was measured at 415 nm, and results were expressed as mg equivalents of quercetin per g (mg QE/g).

Caffeoylquinic acid content (CAC) was also determined (Griffiths *et al.*, 1992). An aliquot of each extract (100 µL, 5 mg/mL) was homogenized with 200 µL of urea (0.17 M), 200 µL of glacial acetic acid (0.1 M) and 500 µL of distilled water. The resultant solution was mixed with 500 µL of  $\text{NaNO}_2$  (0.14 M) and 500 µL of NaOH (1 M), centrifuged at 2,250 x g for 10 min at 4 °C (Sorvall ST18R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The absorbance was measured at 510 nm, and results

were expressed as mg equivalents of chlorogenic acid per g (mg CAE/g).

**Free-radical scavenging activity**

The free-radical scavenging activity (FRSA) was determined by the DPPH test (Molyneux, 2004). An aliquot of each extract (100 µL, 5 mg/mL) were homogenized with 100 µL of DPPH<sup>•</sup> solution (300 µmol), and incubated for 30 min at 25 °C, in the dark. Ascorbic acid (25 µg/mL) was used as a positive control. The absorbance was measured at 520 nm, and results expressed as FRSA (%) = [(Absorbance of DPPH<sup>•</sup> solution at 0 min) - (Absorbance of DPPH<sup>•</sup> solution + extract at 1 h) / [(Absorbance of DPPH<sup>•</sup> solution at 0 min)] × 100.

**Radical cation scavenging activity**

The radical cation scavenging activity (RCSA) was determined by the ABTS<sup>•+</sup> test (Re *et al.*, 1999). Prior to obtain the radical cation, equal parts of ABTS solution (7 mM) and potassium persulfate (2.45 mM) were homogenized and incubated for 16 h at 25 °C, in the dark. Afterward, the formed radical was diluted with an ethanol solution to obtain an absorbance of 0.8, and 20 µL of each extract (5 mg/mL) was mixed with 180 µL of the radical. Ascorbic acid (25 µg/mL) was used as a positive control. The absorbance was measured at 734 nm, and results were expressed as RCSA (%) = [(Absorbance of ABTS<sup>•+</sup> solution at 0 min) - (Absorbance of ABTS<sup>•+</sup> solution + extract at 10 min) / [(Absorbance of ABTS<sup>•+</sup> solution at 0 min)] × 100.

**Reducing power ability**

The reducing power ability (RPA) was measured by the Prussian-blue test (Berker *et al.*, 2010). An aliquot of each extract (100 µL, 5 mg/mL) was homogenized with 300 µL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 300 µL of potassium ferricyanide (1 %, w/v), and incubated in a water bath for 20 min at 50 °C. The resultant solution was mixed with 300 µL of trichloroacetic acid (10 %, w/v) and centrifuged at 4,200 x g for 10 min at 4 °C. Thereafter, 500 µL of the supernatant was mixed with 100 µL of distilled water and 250 µL of ferric chloride (0.1 %, w/v). Ascorbic acid (25 µg/mL) was used as a positive control. The absorbance was measured at 700 nm, and results expressed as absorbance increase at the same wavelength.

**Ferric-reducing antioxidant power**

The ferric-reducing antioxidant power (FRAP) test was also determined (Benzie and Strain, 1999). An aliquot of each extract (20 µL, 5 mg/mL) was homogenized with 180 µL of FRAP solution [10:1:1, 300 mM buffer sodium acetate in glacial acetic acid at pH 3.6 and 10 mM 4,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPZ) in 40 nM HCl and 20 mM  $\text{FeCl}_3$ ] and incubated for 8 min at 25 °C, in the dark. Ascorbic acid (25 µg/mL) was used as a positive control. The absorbance was measured at 595 nm, and results were expressed as mg of  $\text{Fe}^{2+}$  equivalents per g (mg  $\text{Fe}^{2+}$ /g).

### Lipid oxidation in a meat system

The lipid oxidation (LOX) was measured by the TBARS test (Kim *et al.*, 2016). An aliquot of each extract (1 mL, 5 mg/mL) were homogenized with 10 mL of an aqueous pork meat extract (10 %, w/v), and incubated at 37 °C for 8 h in a water bath. After, 0.5 mL of the mixture were mixed with 1 mL of TCA (10 %, w/v) and 1.5 mL TBA solution (0.02 M), placed in a water bath for 20 min at 97 °C, and then cooled. The absorbance was measured at 531 nm, and results were expressed as mg of malondialdehyde per kg of meat (mg MDA/kg).

### Statistical analysis

Results obtained from physicochemical, WHO and OHC, antioxidant, phytochemical content, antiradical, reducing power, and lipid oxidation inhibition tests, were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. These data from the three independent trials were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), while Tukey tests were conducted for means comparison at  $p < 0.05$ . In addition, results of qualitative phytochemical screening, the rest of the test of techno-functional properties and antioxidant activity were expressed as follows: (+), present slight functionality; (++) , present moderate functionality; (+++), present high functionality; (-), absent.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physicochemical properties

Table 1 reports the physicochemical properties of the coffee residues compared to the commercial standard. The results show that coffee silverskin powder and flake showed lower pH values than texturized soy ( $p < 0.05$ ). Also, results of color parameters write down that coffee silverskin powder and flakes showed lower  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  and  $h^*$  values than texturized soy, as well as the highest  $a^*$  values ( $p < 0.05$ ), while coffee silverskin powder showed the lowest  $L^*$  values ( $p < 0.05$ ). In addition, the color data also includes information related to the RGB and Hex color of soybeans and the silverskin of coffee in flakes and flour, which according to these the color name is light brown, roman coffee or brown bear, and deep coffee or bole, respectively.

**Table 1.** Physicochemical properties of coffee silverskin.

**Tabla 1.** Propiedades físicoquímicas de la piel plateada de café.

Item	Soy	Coffee residue	
		Flake	Powder
pH values	6.43 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	6.09 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.30 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Color coordinates			
$L^*$ (lightness)	72.82 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	40.27 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup>	35.94 $\pm$ 1.92 <sup>a</sup>
$a^*$ (redness)	5.47 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	7.04 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	7.57 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
$b^*$ (yellowness)	27.43 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	18.04 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	18.78 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>
$C^*$ (Chroma)	27.92 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	19.36 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	20.25 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>
$h^*$ (hue angle)	79.13 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	60.68 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	68.06 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>
RGB			
Hex color	#CEAE81	#745A42	#6A4F37
Color name	Light brown	Roman coffee or brown bear	Deep coffee or bole

Values expressed as mean  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments ( $n = 9$ ). Different superscripts (a-c) between the same row differ significantly ( $p < 0.05$ ).

A recent work proposed coffee silverskin powder derived from a mixture of five Arabicas and five Robusta varieties as a potential food-safe ingredient, thus, measuring physicochemical parameters like pH (5.34) and color ( $L^* = 20.8$ ,  $a^* = 4.27$ ,  $b^* = 13.4$ ,  $C^* = 14.2$ ). They concluded that pH values could be associated with phenolic components. At the same time, the color depends on the interaction of constitutive components (polyphenols, melanoidins, among others), protein degradation, and Maillard reactions by the roasting process (Martuscelli *et al.*, 2021b). Another study showed that a reduction of particle size in coffee beans increases the sensory acidity in the beverage, which denotes in the extractable compounds (Getaneh *et al.*, 2020).

In contrast with our study, a decrease was reported for pH values of coffee parchment residue (*C. arabica*) by effect of the milling procedure, which was associated with the bioavailability of certain phytochemicals such as phenolic acids (Benitez *et al.*, 2019). It is important to know pH values of natural ingredients because this allows knowing the type of food matrix into which they could be incorporated without affecting their functional properties (López-Marcos *et al.*, 2015; Benitez *et al.*, 2019). In addition, color also plays a key role in the perception, acquisition, and consumption of food. Therefore, knowing and measuring this sensory attribute is crucial for chefs, food bloggers, packaging designers, industrial food processors, among others (Spence, 2018). In agreement, it has been proven that a reduction in particle size  $\times$  time does not affect  $a^*$  values (Mugabi, 2021). While a reduction in particle size of various powders rich in fiber reduce  $L^*$  values, which show that samples became darker (Liu *et al.*, 2016).

### Techno-functional properties

According to the *Codex Alimentarius* (1995), food additives are employed for different purposes, such as sweeteners, flavor enhancers, and colorants, as well as pH regulators and bind food components. In this context, Table 2 reports the techno-functional properties of coffee residues compared to the commercial standard. The results say that coffee silverskin flakes showed the highest WHC and OHC compared to coffee

**Table 2.** Techno-functional properties of coffee silverskin.**Tabla 2.** Propiedades tecno-funcionales de la piel plateada de café.

Item	Soy	Coffee residue	
		Flake	Powder
WHC (%)	49.75 ± 1.05 <sup>b</sup>	53.75 ± 1.24 <sup>c</sup>	29.09 ± 0.03 <sup>a</sup>
OHC (%)	15.79 ± 0.34 <sup>a</sup>	52.90 ± 1.67 <sup>c</sup>	36.28 ± 1.13 <sup>b</sup>
SC	+	+	+
FC	+	+	+
FS	+	+	+
EC	+++	-	-
ES	+++	-	-
GC			
0%	-	-	-
2.5%	-	-	-
5%	++	-	-
10%	+++	-	-
15%	+++	-	-
20%	+++	-	-

Values expressed as mean ± standard deviation of at least three independent experiments (n=9). Different superscripts (a-c) between the same row differ significantly ( $p < 0.05$ ).

WHC, water-holding capacity; OHC, oil-holding capacity; SC, swelling capacity; FC, foaming capacity; EC, emulsion capacity; ES, emulsion stability; GC, gelling capacity. (+), present slight functionality; (++) , present moderate functionality; (+++), present high functionality; (-), absent.

silverskin powder and texturized soy. The WHC of coffee residues depends on the polysaccharides content in coffee residues. A reduction of these components during processing could affect WHC due to a lack of site interactions for water retention. This parameter is desirable in meat products like sausages because these residues can absorb water without dissolving proteins. While OHC of coffee residues depends on the surface availability of hydrophobic non-polar chains, such as dietary components or amino acids, which bind the hydrocarbon side chain of oil. This parameter is related to the physical entrapment of oil and food stabilization, which could function as a flavoring retainer (Benitez *et al.*, 2019).

Further, all samples exert slight SC, FC, and FS, without effect of milling process. While no EC, ES, and GC were shown in coffee silverskin powder, they were the highest in texturized soy. In agreement, it has been reported that a mixture of coffee silverskin powder (*C. arabica* and *C. robusta*) exerts WHC and OHC (Martuscelli *et al.*, 2021b). Also, previous work revealed that coffee silverskin and spent coffee grounds powders (a mixture of *C. arabica* and *C. robusta*) showed approximately 50 % of WHC and OHC. In disagree with our study, both residues showed EC and ES (Ballesteros *et al.*, 2014). Additionally, it has been reported a decrease of WHC values of coffee parchment residue (*C. arabica*) by effect of the milling procedure. In contrast with our study, OHC values were unaffected (Benitez *et al.*, 2019).

WHC and OHC are important parameters that express the potential of an ingredient to retain water and oil in a food matrix (López-Marcos *et al.*, 2015; Martuscelli *et al.*, 2021b). SC is the capacity of an ingredient to increase the surface volume in the presence of excess water (Benitez *et al.*, 2019), while FC and FS express the capacity of an ingredient to increase the interfacial area and the effectiveness to maintain the foam stable after the time (Haque *et al.*, 2020). EC express the capacity of an ingredient to form a homogeneous dispersion of two immiscible liquids or emulsion, while ES describes the effectiveness of an ingredient in maintaining a stable emulsion after the thermal effect (Ballesteros *et al.*, 2014; López-Marcos *et al.*, 2015; Martuscelli *et al.*, 2021b).

### Antioxidant properties

Moreover, phytochemicals (from the Greek word Phyto, meaning plant) are bioactive chemical compounds found in different amounts in plant parts (fruits, seeds, flowers, leaves, stems, and roots), which depends on plant species, growing, and processing conditions. Also, it is well known that phytochemicals improve the protection to plant cells against environmental hazards like pollution, stress, UV-exposure, and pathogenic damage. Although these compounds are not essential nutrients for human body, it has been reported that they exert several biological functions of interest for the food industry (Saxena *et al.*, 2013). Table 3 reports the phytochemical content of the coffee residues compared to the commercial standard. The results of the qualitative phytochemical profile showed that phenols and

**Table 3.** Phytochemical content of coffee silverskin.**Tabla 3.** Contenido de fitoquímicos de la piel plateada de café.

Qualitative profile	Soy	Coffee residue	
		Flake	Powder
Phenols	+	++	+++
Flavonoids	+	++	++
Caffeoylquinic acid	-	++	+++
Alkaloids	-	+	++
Terpenoids	-	-	-
Steroids	-	-	-
Saponins	-	-	-
Quantitative profile	Soy	Coffee residue	
		Flake	Powder
TPC (mg GAE/g)	115.07 ± 3.51 <sup>a</sup>	263.31 ± 2.90 <sup>b</sup>	268.17 ± 2.39 <sup>b</sup>
TFC (mg QE/g)	55.08 ± 2.08 <sup>a</sup>	64.42 ± 2.60 <sup>b</sup>	64.39 ± 2.36 <sup>b</sup>
CAC (mg CAE/g)	25.47 ± 0.51 <sup>a</sup>	74.48 ± 1.90 <sup>b</sup>	82.59 ± 1.78 <sup>c</sup>

(+), slightly present; (++) , moderately present; (+++), highly present; (-), absent.

Values expressed as mean ± standard deviation of at least three independent experiments (n = 9). TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoid content; CAC, caffeoylquinic acid content. Different superscripts (a-c) between the same row differ significantly ( $p < 0.05$ ).



caffeoylquinic acid were highly present in coffee silverskin powder, while these compounds were not detected in texturized soy. Flavonoids were moderately present in both coffee residues, and coffee silverskin flakes showed moderately presence of alkaloids. In addition, terpenoids, steroids, and saponins were not detected in all samples. Regarding the quantitative profile, both coffee residues showed high ( $p < 0.05$ ) TPC and TFC values ( $>200$  mg GAE and 60 mg QE/g, respectively) than texturized soy, while coffee silverskin powder showed high CAC (approx. 80 mg CAE/g) than coffee silverskin flakes and texturized soy ( $p < 0.05$ ).

It has been evidenced that soy is an important source of nutrients like proteins, essential amino acids, and carbohydrates, although oligosaccharides, stachyose, and raffinose, trypsin inhibitors, lectins, gliadin, phytates, mycotoxins, and saponins have been considered antinutritional substances in soy, which are inactivated by adequate thermal processing (Banaszkiewicz, 2011). In agreement, a preliminary phytochemical screening showed the presence of alkaloids and flavonoids in an ethanol extract obtained from coffee silverskin powder (*C. arabica*). In contrast, saponins and terpenoids were also identified in this extract (Al-Yousef *et al.*, 2017). In addition, a quantitative screening demonstrated the presence of phenolic, flavonoids, and caffeoylquinic acid in extracts obtained from coffee residues (*C. arabica*), including coffee silverskin and spent coffee grounds (Zengin *et al.*, 2020). Although, phytochemicals are present in diverse types of waste from the coffee processing industry (Ballesteros *et al.*, 2014; Zengin *et al.*, 2020), it has been also demonstrated that a reduction of the particle size improves chemical compound recovery. For example, an increase in carbohydrates, phenolic, and flavonoid content of coffee parchment residue (*C. arabica*) was reported after the milling procedure (Benitez *et al.*, 2019).

**Table 4.** Antioxidant properties of coffee silverskin.

**Tabla 4.** Propiedades antioxidantes de la piel plateada de café.

Test	Ascorbic acid	Coffee residue	
		Flake	Powder
FRSA (% DPPH <sup>•</sup> inhibition)	96.10 ± 0.15 <sup>b</sup>	39.42 ± 2.12 <sup>a</sup>	38.21 ± 3.39 <sup>a</sup>
RCSA (% ABTS <sup>•+</sup> inhibition)	90.25 ± 1.52 <sup>b</sup>	80.22 ± 0.47 <sup>a</sup>	87.89 ± 2.41 <sup>a</sup>
RPA (Abs at 700 nm)	1.22 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.90 ± 0.05 <sup>a</sup>	115.07 ± 3.51 <sup>b</sup>
FRAP (mg Fe <sup>2+</sup> /g)	2.90 ± 0.15 <sup>c</sup>	1.55 ± 0.23 <sup>a</sup>	2.65 ± 0.13 <sup>b</sup>
TBARS (mg MDA/kg)	0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>

Values expressed as mean ± standard deviation of at least three independent experiments ( $n = 9$ ). FRSA, free-radical scavenging activity; RCSA, radical-cation scavenging activity; RPA, reducing power ability; FRAP, ferric-reducing antioxidant power; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances. Different superscripts (a-c) between the same row differ significantly ( $p < 0.05$ ).

The *Codex Alimentarius* (1995) also indicate that food additives are used with preservative purposes, for example, to function as an antimicrobial agent and improve antioxidant effect against the oxidation process. In this regard, Table 4 shows the antioxidant properties of the coffee residues compared with a commercial antioxidant standard (ascorbic acid, Asc), and the results indicate that Asc showed higher FRSA ( $> 90$  % of inhibition) than coffee silverskin powder and flakes (approx. 40 % of inhibition for both), while, Asc and coffee silverskin powder showed higher RCSA activity (approx. 90 % of inhibition for both) than coffee silverskin flakes ( $< 85$  % of inhibition) ( $p < 0.05$ ), which indicate a positive effect of milling procedure. Concerning reducing power, RPA and FRAP values were presented in the order Asc  $>$  coffee silverskin powder  $>$  coffee silverskin flakes ( $p < 0.05$ ). In addition, coffee silverskin powder showed the lowest TBARS values ( $< 0.1$  mg MDA/kg), which indicates a positive effect of the milling procedure.

In agreement, the antiradical (FRSA and RCSA) and the reducing power activity (FRAP) of extracts obtained from coffee residues (*C. arabica*) like silverskin and spent coffee grounds has been demonstrated (Zengin *et al.*, 2020). A previous study indicates that coffee silverskin powders and spent coffee grounds (mixture of *C. arabica* and *C. robusta*) exert antiradical FRSA and FRAP potential (Ballesteros *et al.*, 2014). Additionally, an increase of RCSA of coffee parchment residue (*C. arabica*) was observed after the milling procedure (Benitez *et al.*, 2019). The FRSA (DPPH<sup>•</sup> assay) are methods that involve the hydrogen atom transfer as reaction mechanisms [free radical (X<sup>•</sup>) + Antioxidant compound (OH) → Neutralized radical (XH + O<sup>•</sup>)], while the RCSA (ABTS<sup>•+</sup> assay), RPA (Prussian-blue) and FRAP methods involve the electron transfer mechanisms [radical cation (X<sup>•+</sup>) + Antioxidant compound (OH) → Neutralized radical (XH + O<sup>•+</sup>)] (Berker *et al.*, 2010; Echegaray *et al.*, 2021). In addition, it has been reported that TBARS method could involve both mechanisms (Velázquez *et al.*, 2021).

## CONCLUSIONS

Physicochemical results indicated that coffee silverskin flakes and powder showed pH near to neutrality, and the color was Roman coffee and Deep coffee, respectively, which indicates that the milling process changed this parameter. In addition, techno-functional determinations showed that coffee silverskin flakes showed the highest WHC and OHC, while both coffee residues exert slight SC, FC, and FS, without the effect of the milling process. However, both residues not showed EC, ES, and GC. Furthermore, phytochemical screening revealed the presence of metabolites in coffee silverskin (powder  $>$  flakes), like phenols, flavonoids, caffeoylquinic acid, and alkaloids, while terpenoids, steroids, and saponins were not detected. Regarding antioxidant activity, coffee silverskin powder showed high FRSA, RCSA, RPA, and FRAP values, as well as the lowest TBARS values, which indicate that the milling process increases antioxidant properties. In conclusion, coffee silverskin can be proposed as a functional ingredient for the food industry.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge CONACYT for the fellowship of the project #739, program "Investigadoras e Investigadores por México".

## REFERENCES

- Al-Yousef, H.M., Sawab, A. and Alruhimi, M. 2017. Pharmacognostic studies on coffee Arabica L. husks: a brilliant source of antioxidant agents. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 4: 86-92.
- Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2(4): 875-877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- AOAC. 2020. AOAC 943.02, pH of flour, potentiometric method. Association of Official Analytical Chemists. [Consulted 27 April 2022]. Available in: [http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main\\_page=product\\_info&products\\_id=937](http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=937)
- Balestra, F. and Petracci, M. 2019. Technofunctional ingredients for meat products: Current challenges. In *Sustainable meat production and processing*. C.M. Galanakis (ed.), pp 45-68. Academic Press. Elsevier. Inc., New York.
- Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A. and Mussatto, S.I. 2014. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*. 7(12): 3493-3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Banaszkiewicz, T. 2011. Nutritional value of soybean Meal. In: *Soybean and Nutrition*. Hany El-Shemy (Ed.), pp 1-23. IntechOpen, Croatia.
- Benitez, V., Rebollo-Hernanz, M., Hernanz, S., Chantres, S., Aguilera, Y. and Martin-Cabrejas, M.A. 2019. Coffee parchment as a new dietary fiber ingredient: Functional and physiological characterization. *Food Research International*. 122: 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.002>
- Benzie, I.F. and Strain, J.J. 1999. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measurement of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymology*. 299: 15-27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)
- Berker, K.I., Güçlü, K., Demirata, B. and Apak, R. 2010. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*. 2: 1770-1778. <https://doi.org/10.1039/C0AY00245C>
- CDRSSA. 2019. Evolución de la producción y consumo de alimentos en México (2000-2018). [Consulted 27 April 2022]. Available in: [http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/13MSMM-F\\_EvolucionProd-Cons.pdf](http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/13MSMM-F_EvolucionProd-Cons.pdf)
- Codex Alimentarius. 1995. Norma general para los aditivos alimentarios [Consulted 27 April 2022]. Available in: [http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS\\_192s.pdf](http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf)
- COMECARNE. 2021. Consejo Mexicano de la Carne, compendio estadístico. [Consulted 27 April 2022]. Available in: <https://comecarne.us2.list-manage.com/track/click?u=22650f36f23cf8841c5225d13&id=85af93fc6f&e=834f0eefc8>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F.J., Zhang, W. and Lorenzo, J.M. 2019. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*. 8: 429. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- Echegaray, N., Pateiro, M., Munekata, P.E., Lorenzo, J.M., Chabani, Z., Farag, M.A. and Domínguez, R. 2021. Measurement of Antioxidant Capacity of meat and meat products: methods and applications. *Molecules*. 26(13): 3880. <https://doi.org/10.3390/molecules26133880>
- Getaneh, E., Fanta, S. W. and Satheesh, N. (2020). Effect of broken coffee beans particle size, roasting temperature, and roasting time on quality of coffee beverage. *Journal of Food Quality*. Article ID 8871577: 1-15. <https://doi.org/10.1155/2020/8871577>
- Griffiths, D.W., Bain, H. and Dale, M.F.B. 1992. Development of a rapid colorimetric method for the determination of chlorogenic acid in freeze-dried potato tubers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58(1): 41-48. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740580108>
- Haque, M.A., Akter, F., Rahman, H. and Baqui, M.A. 2020. Jackfruit seeds protein isolate by spray drying method: the functional and physicochemical characteristics. *Food and Nutrition Sciences*. 11: 355-374. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.115026>
- Jully, K.M.M., Toto, C.S. and Were, L. 2016. Antioxidant effect of spent, ground, and lyophilized brew from roasted coffee in frozen cooked pork patties. *LWT-Food Science and Technology*. 66: 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.046>
- Kim, J.H., Ahn, D.U., Eun, J.B. and Moon, S.H. 2016. Antioxidant effect of extracts from the coffee residue in raw and cooked meat. *Antioxidants*. 5: 21. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fantiox5030021>
- Liu, T., Hou, G. G., Lee, B., Marquart, L. and Dubat, A. 2016. Effects of particle size on the quality attributes of reconstituted whole-wheat flour and tortillas made from it. *Journal of Cereal Science*. 71: 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.08.013>
- López-Marcos, M.C., Bailina, C., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J.A. and Fernández-López, J. 2015. Properties of dietary fibers from agroindustrial coproducts as source for fiber-enriched foods. *Food and Bioprocess Technology*. 8: 2400-2408. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1591-z>
- Martuscelli, M., Esposito, L. and Mastrocola, D. 2021a. The role of coffee silverskin against oxidative phenomena in newly formulated chicken meat burgers after cooking. *Foods*. 10: 1833. <https://doi.org/10.3390/foods10081833>
- Martuscelli, M., Esposito, L., Di Mattia, C. D., Ricci, A. and Mastrocola, D. 2021b. Characterization of coffee silverskin as potential food-safe ingredient. *Foods*. 10(6): 1367. <https://doi.org/10.3390/foods10061367>
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26: 211-219.
- Mugabi, R. 2021. Effect of particle size on color of ground coffee. *Asian Food Science Journal*. 20(10): 137-144.
- Oswell, N.J., Thippareddi, H. and Pegg, R.B. 2018. Practical use of natural antioxidants in meat products in the US: A review. *Meat Science*. 145: 469-479. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.020>
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. 2004. Validated methods for the quantification

- of biologically active constituents of poplar type propolis. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 15(4): 235-240. <https://doi.org/10.1002/pca.777>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Robertson, A.R., Lozano, R.D., Alman, D.H., Orchard, S.E., Keitch, J.A., Connely, R., Graham, L.A., Acree, W.L., John, R.S., Hoban, R.F., et al. 1977. CIE Recommendations on uniform color spaces, color-difference equations, and metric color terms. *Color Research and Application*. 2: 5-6.
- Samejo, M.Q., Memon, S., Bhangar, M.I. and Khan, K.M. 2011. Preliminary phytochemicals screening of *Calligonum polygonoides* Linn. *Journal of Pharmacy Research*. 4: 4402-4403.
- Samejo, M.Q., Sumbul, A., Shah, S., Memon, S.B. and Chundrigar, S. 2013. Phytochemical screening of *Tamarix dioica* Roxb. ex Roch. *Journal of Pharmacy Research*. 7: 181-183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.02.017>
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D. and Gupta, A. 2013. Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1: 168-182.
- Spence, C. 2018. Background colour & its impact on food perception & behaviour. *Food Quality and Preference*. 68: 156-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.02.012>
- USDA. 2021. US Department of Agriculture, additives in meat and poultry products. [Consulted 27 April 2022]. Available in: <https://www.fsis.usda.gov/food-safety/safe-food-handling-and-preparation/food-safety-basics/additives-meat-and-poultry>
- Velázquez, L., Quiñones, J., Díaz, R., Pateiro, M., Lorenzo, J.M. and Sepúlveda, N. 2021. Natural antioxidants from endemic leaves in the elaboration of processed meat products: current status. *Antioxidants*. 10: 1396. <https://doi.org/10.3390/antiox10091396>
- Zengin, G., Sinan, K.I., Mahomoodally, M.F., Angeloni, S., Mustafa, A.M., Vittori, S., Maggi, F. and Caprioli, G. 2020. Chemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory properties of different extracts obtained from spent coffee ground and coffee silverskin. *Foods*. 9(6): 713. <https://doi.org/10.3390/foods9060713>.



# Inclusión dietaria de clinoptilolita como aditivo en la producción de rumiantes

Dietary inclusion of clinoptilolite as a feed additive in ruminants production

Ana Tánori-Lozano<sup>a</sup>, Maricela Montalvo-Corral<sup>a</sup>, Araceli Pinelli-Saavedra<sup>a</sup>, Martín Valenzuela-Melendres<sup>a</sup>, Zamorano-García Libertad<sup>a</sup>, José Luis Dávila-Ramírez<sup>b</sup>, Humberto González-Ríos<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas # 46. Colonia La Victoria. CP. 83304, Hermosillo Sonora, México.

<sup>b</sup> Ciencia Aplicada para el Desarrollo Tecnológico, A.C. (CIADETEC, A.C.), Pedro Moreno # 24, Col. Centro Norte. Hermosillo, Sonora, México.

## RESUMEN

En los últimos años, las investigaciones se han centrado en el estudio, desarrollo y validación de compuestos de origen natural que se puedan utilizar de manera eficaz y segura como alternativa a los promotores de crecimiento convencionales que se emplean rutinariamente en la producción pecuaria, de modo que estos no comprometan el bienestar animal, ni las características de calidad de la carne. Una de estas alternativas es el uso de minerales como las zeolitas de tipo clinoptilolita. La clinoptilolita al ser adicionada al alimento de rumiantes, ha demostrado tener efectos benéficos sobre algunos parámetros de la fermentación ruminal, lo cual se traduce en una mejora en el comportamiento productivo del animal. Los reportes sobre el uso en rumiantes son limitados y en algunos casos los resultados son inconsistentes. En esta revisión se discuten los efectos que se han encontrado en ovinos y bovinos al ser suplementados con distintas dosis de clinoptilolita.

**Palabras clave:** Rumiantes, Clinoptilolita, Comportamiento productivo, Fermentación ruminal.

## ABSTRACT

In recent years, research has focused on the study, development and validation of compounds of natural origin that can be used effectively and safely as an alternative to conventional growth promoters routinely used in livestock production, so that these do not compromise animal welfare, or the meat quality characteristics. One of these alternatives is the use of minerals such as zeolites of the clinoptilolite type. Clinoptilolite, when added to ruminant feed, has been shown to have beneficial effects on some parameters of ruminal fermentation, which translates into an improvement in the productive behavior of the animal. However, there is a lack of studies on ruminants, and in some cases have been inconclusive. Thus, the aim of this review is to discuss the effects of the dietary inclusion of clinoptilolite as a feed additive in ovinos, and bovines supplemented with different levels of Clinoptilolite

**Key words:** Ruminants, Zeolites, Productive performance, Ruminal fermentation.

\*Autor para correspondencia: Humberto González-Ríos  
Correo electrónico: hugory@ciad.mx

Recibido: 3 de junio de 2022

Aceptado: 21 de septiembre de 2022

## INTRODUCCIÓN

El cambio climático y la resistencia a antibióticos son dos de las principales amenazas a la salud animal y humana, y entre los diferentes factores que contribuyen a su impacto, la ganadería tiene una participación importante debido a la generación de gases de efecto invernadero (GEI) que se producen durante la fermentación ruminal (FR) (Gerber *et al.*, 2013). A su vez, la demanda de carne y leche proveniente de rumiantes aumenta de manera proporcional al incremento de la población humana (Baldi y Gottardo, 2017), por lo cual, la industria pecuaria además de aumentar la población de sus hatos ganaderos, ha buscado implementar diferentes estrategias que garanticen una eficiencia en la FR y en la utilización de alimento con el fin de obtener un mayor rendimiento de leche y carne. Dentro de estas estrategias se encuentra el uso de aditivos que modulen algunos parámetros de la FR, donde de manera recurrente los productores utilizan ionóforos o antibióticos promotores de crecimiento (APC) en dosis subterapéuticas con el objetivo de promover el crecimiento, mejorar la conversión alimenticia e incluso prevenir infecciones (Dibner y Richards, 2005). Su mecanismo de acción se encuentra relacionado con la inhibición en algunas poblaciones de microorganismos no deseados, lo cual promueve cambios en el microbioma ruminal (MOR) y consecuentemente en la dinámica de la FR. Estos cambios mejoran la utilización de nutrientes y uso de la energía (Dennis *et al.*, 1981; Gaskin *et al.*, 2002; Dibner y Richards, 2005). Sin embargo, existe la preocupación de que el uso imprudente de los APC conduzca al desarrollo de resistencias antimicrobianas y transferencia de genes resistentes a antibióticos a humanos, representando un peligro para la salud del consumidor (Castanon, 2007; Mathew *et al.*, 2007). Por ello se han propuesto otro tipo de aditivos alimenticios con propiedades nutraceuticas, capaces de sustituir a estos compuestos, manteniendo los beneficios reportados y garantizando una producción sustentable.

Dentro de este grupo de aditivos se encuentran los de uso común como ácidos orgánicos, enzimas digestivas, probióticos y prebióticos; además se encuentran aquellos aditivos alternativos como extractos vegetales y minerales como zeolitas de tipo clinoptilolita (Spears, 1996; Benchaar

*et al.*, 2008; Meschiatti *et al.*, 2019; Zayed *et al.*, 2020). Debido a su potencial en la producción animal, recientemente se ha incrementado el interés en el uso de estos aditivos alternativos. Sin embargo; las dosis, tipos de dietas o tiempos de exposición efectivos en rumiantes o monogástricos aún no se han dilucidado completamente, observándose en algunos casos efectos nulos o poco convenientes, aunado a que su uso prolongado podría conllevar a una adaptación metabólica, reduciendo el efecto esperado en el animal (Patra y Saxena, 2009; Peña-Torres *et al.*, 2019).

En el caso particular de la clinoptilolita (CTL), las dosis efectivas para monogástricos son conocidas y en la industria avícola es común incluirlas en la dieta de las aves de postura y pollos de engorda (Kyriakis *et al.*, 2002; FEEDAP, 2013; Hcini *et al.*, 2018). Por otra parte, aunque algunas investigaciones han reportado cambios favorables en los parámetros de la FR, la adición de CTL en la dieta de rumiantes no es una práctica rutinaria (McCullum y Galyean, 1983; Khachlouf *et al.*, 2018; Roque-Jiménez *et al.*, 2018). Esta revisión tiene como objetivo mostrar la información actual del uso de la CTL y su efecto en la producción de bovinos y ovinos.

### Definición y propiedades de las zeolitas tipo Clinoptilolita

Las zeolitas son aluminosilicatos hidratados de estructura tridimensional constituidos por tetraedros de óxido de silicio y aluminio, los cuales se encuentran compensados con cationes intercambiables de potasio, calcio, magnesio y sodio; cuya función es estabilizar la carga de material (Mump-ton, 1998; Coombs *et al.*, 1998). Su estructura les permite formar cavidades ocupadas por iones relativamente inocuos y moléculas de agua, las cuales muestran gran libertad de movimiento. Esto les brinda sus propiedades específicas: el intercambio catiónico, tamizado molecular, adsorción y la deshidratación reversible (Bish y Ming, 2001; Li *et al.*, 2017).

Las zeolitas se formaron a partir de la vitrificación de las cenizas volcánicas, es por ello que se encuentran catalogadas como minerales provenientes de rocas volcánicas, de los cuales se han registrado más de 50 especies (divididas en grupos) donde cada una tiene sus características fisicoquímicas únicas. En la industria pecuaria la zeolita de tipo CTL es la más empleada como aditivo alimenticio debido a que ha mostrado tener efectos benéficos en el rendimiento y salud animal, además, ha demostrado ser un aditivo inerte en el sistema digestivo, debido a que no reacciona químicamente con otros nutrientes o fluidos corporales, por lo que no causa efectos adversos a la salud (Coombs *et al.*, 1998; Valpotić *et al.*, 2017).

La CTL ( $\text{Ca Na}_4 \text{K}_4 [\text{AlO}_2]_5 [\text{SiO}_2]_{30} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ ) tiene una relación silicio/aluminio  $\geq 4$ , misma que la hace pertenecer al grupo de las zeolitas de tipo heulandita (Bish y Ming, 2001; Jha y Singh, 2016), es clasificada como un material microporoso (0.30 a 4 nm) con una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 2.2 meq/100g (Jha y Singh, 2016; Król, 2020) y una afinidad más pronunciada por algunos elementos:  $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+$  (Ames, 1960).

Dentro de los efectos estudiados que ha tenido la CTL, se encuentran la desintoxicación de organismos humanos y animales, efecto antibacterial, mejoras en la nutrición e inmunidad de los animales, dosificación de fármacos, separación de biomoléculas, purificación de agua, suelo y aire, absorbente de contaminantes radioactivos y descontaminación de aguas residuales descargadas de centro nucleares (Rostami y Jafari, 2014; Delkash *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Yuna, 2016; Valpotić *et al.*, 2017). Debido a sus propiedades presentadas en los animales de engorde, principalmente en aves y cerdos, recientemente se ha propuesto como alternativa para sustituir o complementar el efecto de los promotores de crecimiento tradicionales. El aprovechamiento de los nutrientes cuando se suplementa con este mineral, es atribuido principalmente a dos propiedades específicas, su CIC y su competencia como adsorbente. Estas propiedades posibilitan drenar moléculas no deseadas del organismo, regular la microbiota intestinal, permitiendo con ello un mayor tiempo de retención de los nutrientes, además de una liberación dosificada de los mismos en el tracto digestivo (Wu *et al.*, 2013; Tondar *et al.*, 2014; Valpotić *et al.*, 2016).

### Adsorción e intercambio catiónico de las Zeolitas

La adsorción se describe como un proceso donde ocurren interacciones de tipo físicas, químicas o iónicas entre las moléculas de un adsorbente y adsorbato, las cuales influyen en la concentración de un compuesto o fluido (adsorbato) sobre la superficie de un sólido (adsorbente). La CIC de las zeolitas se considera dentro del proceso de adsorción, debido a que los iones del adsorbato solamente son reemplazados por los iones de compensación de la zeolita a través de interacciones electroestáticas que buscan neutralizar la carga (Kammerer *et al.*, 2019). Por lo tanto, se le conoce como CIC a la capacidad de sustitución o desplazamiento de los cationes de compensación de acuerdo con su radio iónico y concentración de carga. Esta capacidad se relaciona directamente con la cantidad de aluminio que contiene la zeolita; entre menor sea la relación silicio-aluminio, mayor será su CIC (Weitkamp y Puppe, 2013).

Últimamente, investigadores han centrado su interés en el estudio de las propiedades adsorbentes de la zeolita y otros materiales para la recuperación de diferentes compuestos, por una parte, para disminuir la carga orgánica de las aguas residuales y por otro lado para utilizarlos en el sector de la cosmética, farmacéutica y alimentaria, con el fin de enriquecer sus productos a una inversión relativamente económica al tratarse de un material de bajo costo (Ahmaruzzaman, 2008; Thiel *et al.*, 2013; Kammerer *et al.*, 2019). Además, se han realizado distintos trabajos con zeolitas para la dosificación controlada o retención de fármacos, aditivos o nutrientes en el organismo, de tal manera que estos sean mejor aprovechados. Por ejemplo, cuando son incluidos en la dieta de animales de producción, este aprovechamiento se ve reflejado en mejoras en el comportamiento productivo (Toprak *et al.*, 2016; Valpotić *et al.*, 2017). Otra propiedad de las zeolitas, es su capacidad para atrapar a las micotoxinas

encontradas en productos alimenticios para animales, lo cual disminuye el impacto que estas pudieran causar en la salud animal (Di Gregorio *et al.*, 2014).

Un estudio probó la capacidad de las zeolitas para prolongar el tiempo de liberación de un extracto fenólico, dentro de los resultados encontrados, se observó que, en el transcurso de 3 h, solamente se había liberado el 60 % del extracto de los hidrogeles que contenían 3 % de zeolita, este efecto se le atribuye a que la zeolita provocó una mayor reticulación en el material, además de un menor valor de liberación inicial (Cursaru *et al.*, 2020). Mientras tanto, en otro estudio donde se evaluaron las propiedades de desorción de la CTL (se utilizaron tres tamaños de partícula: pequeño, mediano y grande; 1.5-10  $\mu\text{m}$ , 5-16  $\mu\text{m}$  y 11-40  $\mu\text{m}$  respectivamente) modificada con aspirina bajo condiciones gástricas, se encontró que, a un pH de 2.0 y un tamaño de partícula grande (11-40  $\mu\text{m}$ ), la liberación de aspirina fue aproximadamente un 20 % menor que los otros tratamientos. Por otra parte, a un pH de 6.5 (intestinal) se alcanzó el 80 % de liberación de aspirina, lo cual indica que las propiedades de adsorción y desorción de la zeolita son dependientes del pH y tamaño de partícula (Tondar *et al.*, 2014). Con respecto a lo anterior, otros autores han observado que trabajar a un pH menor al pKa de la zeolita favorece la recuperación de moléculas, esto debido a la carga negativa de la zeolita y al principio de Coulomb; por lo que es importante mencionar que el punto de inflexión sobre la influencia del pH en la capacidad de adsorción de la zeolita se encuentra en un valor alrededor de 4.5 (Ahmaruzzaman, 2008; Dávila-Guzman *et al.*, 2012; Tondar *et al.*, 2014).

### Modificación química de las Zeolitas

Con el fin de aprovechar y potencializar las propiedades de las zeolitas, éstas son sometidas a un proceso de modificación o activación de tal manera que este material se pueda emplear como adsorbente o dosificador de fármacos (Tondar *et al.*, 2014; Servatan *et al.*, 2020) o de distintas moléculas orgánicas (Martins *et al.*, 2020), también, mediante el uso de óxidos o iones metálicos como el zinc, cobre o plata, éstas potencializan su efecto bactericida o bacteriostático (Copia *et al.*, 2011; Hagiware *et al.*, 2011; Ambrozova *et al.*, 2017; Milenkovic *et al.*, 2017; Fanta *et al.*, 2019), así mismo se han visto zeolitas impregnadas de urea que son utilizadas en la alimentación de rumiantes (Erwanto *et al.*, 2011; Kardaya *et al.*, 2012; Laza-Knoerr y Dumargue, 2020; Sallam *et al.*, 2022). Este principio se basa en la CIC de la zeolita, misma que le permite descationizar selectiva y parcialmente los cationes de compensación, para posteriormente cargar los cationes de interés según el grado de afinidad con el material (Ames, 1960; Sallam *et al.*, 2022). Por lo general para lograr esta modificación química, las zeolitas son sometidas a un proceso de elución llevado a cabo en soluciones acuosas a una concentración y temperatura conocida (Cerri *et al.*, 2002; Montes-Luna *et al.*, 2015).

La zeolita también puede ser modificada por medio de métodos físicos y mostrar efectos favorables, por ejemplo,

en un estudio donde se incorporó zeolita vibro activada y micronizada en la ración de vacas lecheras, la zeolita demostró reducir las incidencias de infecciones intramamarias de las vacas (Đuričić *et al.*, 2020). Por otra parte, El-Nile *et al.* (2021), estudiaron el efecto que tiene la nano-zeolita (zeolita reducida mecánicamente) sobre los parámetros de la FR en cabras. En este estudio se reportó una reducción en la producción de metano y una mejora en la producción total de ácidos grasos volátiles ruminales (AGV) y ácido propiónico en las cabras suplementadas.

### Uso de la clinoptilolita natural en la industria pecuaria como estrategia de mejora en los parámetros productivos

La zeolita de tipo CTL es empleada en la nutrición animal principalmente por sus efectos sobre la salud de aves, cerdos y vacas lecheras, además es un ingrediente inerte que tiene efectos benéficos sobre la producción; para el caso específico de rumiantes como bovinos y ovinos, se ha observado que además de modular los parámetros de la FR, las zeolitas ocasionan cambios en algunas poblaciones de bacterias y protozoos del MOR (Galindo *et al.*, 1986; Goodarzi y Nanekarani, 2012), reflejándose en la producción de carne y leche.

### Efectos en la fermentación ruminal

La CTL tiene una alta afinidad por los iones de amonio, se ha reportado una captura de hasta el 15% de éstos en el rumen, los cuales son liberados lentamente por un intercambio con los iones de sodio contenidos en la saliva que ingresa al rumen durante la rumia (Mumpton, 1998). Esto favorece la eficiencia en la síntesis de la proteína microbiana y reducción en las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), cuando en la alimentación del rumiante se agregan compuestos nitrogenados no proteicos (NNP) (White y Ohlrogge, 1983; Sallam *et al.*, 2022). Además, se han observado cambios en los parámetros de la FR al incorporar CTL natural o modificada en la dieta de rumiantes (Cuadro 1). Por ejemplo, se han visto mejoras en la relación acetato:propionato (A:P) durante la producción de AGV ruminales (McCollum y Galyean, 1983; Kardaya *et al.*, 2012), además de una reducción de hasta el 49 % en las concentraciones de gas metano (Kardaya *et al.*, 2012; El-Nile *et al.*, 2021).

A continuación, se presentan algunos ejemplos de diferentes estudios donde se evalúan los cambios en los parámetros de la FR y digestibilidad al suplementar a bovinos y ovinos con diferentes dosis de CTL. Por ejemplo, se tomó una muestra de líquido ruminal de ovinos suplementados con dos tipos de CTL y su combinación (cálcica y potásica), y se midió el pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , la concentración total de AGV y población de bacterias a diferentes horas post-alimentación (0, 3, 6 y 10). En este estudio se observó que la CTL cálcica mantuvo el pH ruminal cerca de la neutralidad a las 3, 6 y 10 horas, además, las concentraciones totales de AGV, y la población de bacterias celulolíticas fueron más altos en comparación con los demás tratamientos (Goodarzi y Nanekarani, 20112).

**Cuadro 1:** Cambios en los parámetros de la fermentación ruminal y digestibilidad de bovinos y ovinos suplementados con clinoptilolita  
**Table 1:** Effects of dietary clinoptilolite on rumen fermentation characteristics and digestibility in bovines, and ovines

Tiempo de exposición y dosis empleada	Especie (n)	Efecto observado	Referencia
CTL cálcica y potásica, 0 y 4 % por 3 sem	Ovinos n = 4	↑ pH, población de bacterias celulolíticas, producción total de AGV y absorción del NH <sub>3</sub> -N	Goodarzi & Nanekarani (2012)
Zeolita natural: 0, 20, 40 y 60 g/kg por 52 d	Ovinos Rambouillet n = 40	↑ Producción total de AGV, pH y retención de N	Roque-Jiménez <i>et al.</i> (2018)
CTL al 1.4 % por 12 sem	Vacas Holstein n = 30	T↑ pH ruminal T↓ Concentración total de AGV y ácido propiónico	Dschaak <i>et al.</i> (2010)
CTL-Ca: 0, 10, 20 y 30 g/kg por 35 d	Novillos Holstein n = 4	T↑ Concentración total de AGV, relación A:P ↑ Degradación de la materia orgánica, almidón y el flujo del NH <sub>3</sub> -N al duodeno	Urías-Estrada <i>et al.</i> (2017)
CTL potásica al 0, 1.5, 3 y 4.5 % por 17 d	Ovinos Pelibuey n = 4	↑ Concentración de ácido propiónico	Ruíz <i>et al.</i> (2007)
CTL al 0, 1.25, 2.5 y 5 % por períodos de 14 d	Novillos n = 4	↑ Concentración de ácido propiónico T↑ Concentración total de AGV, digestibilidad de nutrientes ↓ pH y nivel de NH <sub>3</sub> -N	McCullum & Galyean (1983)
CTL al 0, 3, 6 y 9 % por períodos de 17 d	Ovinos n = 8	Cambios en la digestibilidad de la materia seca, proteína y fibra	Ghaemia <i>et al.</i> (2010)
CTL 200 g/d por 12 sem	Vacas Holstein n = 16	↑ pH ↓ Concentración de ácido propiónico	Karatzia <i>et al.</i> (2011)
Zeolita natural al 2 % por 45 d	Ovinos Arabi n = 45	↑ pH y concentración de ácido acético	Mahdavi <i>et al.</i> (2021)
Zeolita al 0, 30 y 60 g/d por 90 d	Ovinos Mehraban n = 48	↑ Digestibilidad de la PC, MO y fibra.	Forouzani <i>et al.</i> (2004)
Zeolita natural 1 % y Zeolita impregnada con urea 2 % por 11 d	Ovinos n=24	↓ pH ruminal, concentración de ácido acético y metano Mejor relación acetato:propionato	Kardaya <i>et al.</i> (2012)
CTL cálcica 3 % por 120 d	Novillos Holstein n = 45	↑ Concentración de NH <sub>3</sub> -N (5.5 h post alimentación)	Sadeghi & Shawrang (2006)
CTL 1 y 2 % por 90 d	Ovinos Barki n = 30	↑ pH y digestibilidad de la PC, MO y fibra. ↓ Nivel de NH <sub>3</sub> -N (3 y 6 h post alimentación)	Ghoneem <i>et al.</i> (2022)

T: Tendencia; NH<sub>3</sub>-N: Nitrógeno amoniacal; AGV: Ácidos grasos volátiles; N: Nitrógeno; PC: Proteína cruda; MO: Materia orgánica

En otro trabajo donde se analizaron los parámetros de la FR, se observó un pH más alto en los corderos suplementados y una mayor producción de AGV al adicionar 40 y 60 g/kg de zeolita en el alimento (Roque-Jiménez *et al.*, 2018). Se puede observar que la mayoría de los estudios han reportado un pH ruminal alcalino en los animales suplementados con CTL (Dschaak *et al.*, 2010; Karatzia *et al.*, 2011; Mahdavi *et al.*, 2021). Sin embargo, en un estudio realizado en novillos donde se probaron 3 dosis diferentes de CTL (1.25, 2.5 y 5 %), se reportó un pH ligeramente ácido en los tratamientos donde se incluyó 2.5 y 5 % de CTL; no obstante, se reportó una mayor concentración de AGV totales y ácido propiónico (McCullum y Galyean, 1983). En este trabajo las concentraciones de AGV tendieron a incrementarse en los grupos experimentales (107.7, 106.6 y 106.8 mmol/L) con respecto al control (104.8) y se presentó un aumento significativo en la producción de ácido propiónico (38.1 vs 35.2%) para el grupo donde se incluyó 2.5 % de CTL en la dieta. El aumento en la producción de AGV y ácido propiónico ha sido constante en ovinos (Ruíz *et al.*, 2007; Goodarzi y Nanekarani, 2012; Roque-

Jiménez *et al.*, 2018; Sallam *et al.*, 2022) y novillos (McCullum y Galyean, 1983; Urías-Estrada *et al.*, 2017) cuando se utilizan dosis mayores al 1.5 % de CTL en la dieta. Por ejemplo, en ovinos de pelo, se reportó un incremento significativo en las concentraciones de propionato al adicionar 1.5 % de CTL en el alimento (Ruíz *et al.*, 2007). Con respecto a los efectos en la digestibilidad, se ha demostrado que la CTL mejora la digestibilidad de los nutrientes, por ejemplo, la inclusión de CTL en la dieta de ovinos redujo la digestibilidad de la materia seca, pero en cambio mejoró la digestibilidad de la proteína, materia orgánica y de la fibra en los ovinos (Forouzani *et al.*, 2004; Ghaemnia *et al.*, 2010; Ghoneem *et al.*, 2022; Sallam *et al.*, 2022) y novillos suplementados con diferentes dosis de CTL (Galindo *et al.*, 1982; McCullum y Galyean, 1983; Urías-Estrada *et al.*, 2017).

Por otra parte, la zeolita modificada también ha demostrado potencial para modular algunos parámetros de la FR, por ejemplo, Kardaya *et al.* (2012), estudiaron el efecto que tiene la zeolita impregnada con urea sobre las características de FR en ovinos. Los resultados mostraron que



tanto la zeolita como la zeolita modificada con urea pueden ser utilizadas para mejorar la relación A:P y reducir hasta en un 37% la producción de metano en el rumen, sin afectar la producción del resto de los AGV. Además, se observó que los tratamientos con zeolita mantuvieron las concentraciones de  $\text{NH}_3\text{-N}$  en rumen y las concentraciones de urea en plasma dentro de un rango normal-bajo. Estos cambios pueden ser atribuidos a la propiedad de adsorción-desorción de la zeolita, permitiéndole crear reservas de  $\text{NH}_3\text{-N}$  en el rumen (Sadeghi y Shawrang, 2006; Kardaya *et al.*, 2012). En la mayoría de los sistemas de producción, el nitrógeno derivado de la degradación de las proteínas se produce por encima de la capacidad de los microorganismos ruminales para utilizarlo para su crecimiento, por lo que el exceso de  $\text{NH}_3\text{-N}$  se absorbe a través de las paredes ruminales e ingresa al ciclo de la urea en el hígado, para posteriormente reingresar al rumen por medio de la saliva o ser excretado en la orina. Esto incrementa la liberación de nitrógeno al medio ambiente y puede generar un aumento en los costos de producción.

El mecanismo de acción de este mineral se encuentra relacionado a las modulaciones que ocasiona en el ambiente ruminal: La zeolita ocasiona un efecto buferizante en el rumen (debido a su alta capacidad de intercambio de iones de  $\text{H}^+$ ), proporcionando condiciones favorables para el desarrollo y la actividad de las bacterias celulolíticas del rumen, además de una mejor eficiencia digestiva y producción de AGV (White y Ohlrogge, 1983; Pond y Mumpton, 1984; Goodarzi y Nanekarani, 2012). Además, las reservas de  $\text{NH}_3\text{-N}$  y su liberación controlada en el rumen debido a la CIC de la zeolita, permite una mayor utilización del nitrógeno de la dieta para la síntesis de proteína microbiana (White y Ohlrogge, 1983; Pond y Mumpton, 1984; Sadeghi y Shawrang, 2006; Erwanto *et al.*, 2011). Así mismo, en la mayoría de los estudios presentados anteriormente, se ha reportado un aumento en las concentraciones de propionato y en la reducción de la síntesis de metano. Estos cambios pueden estar relacionados a la CIC de la zeolita, permitiéndola actuar como sumidero de  $\text{H}^+$  molecular y ocasionando una disminución en su disponibilidad para la reducción de dióxido de carbono a metano por actividad de los metanógenos; otra posible explicación sugiere un efecto directo de la zeolita sobre la composición de las comunidades del MOR y sus productos finales.

Se ha reportado que un cambio en el patrón de producción en los AGV hacia una mayor producción de propionato es consecuencia de una mayor digestión ruminal del almidón o de un uso más eficiente de la energía, debido a que las bacterias ruminales utilizan más iones de  $\text{H}^+$  para la síntesis de propionato en lugar de acetato o metano (Boadi *et al.*, 2004; Urías-Estrada *et al.*, 2017). Los cambios en las concentraciones de propionato y metano podrían beneficiar tanto a la eficiencia de la producción ganadera como al medio ambiente. El metano que se forma durante la FR contribuye al 40 % de los gases de efecto invernadero que se generan en la producción de rumiantes, además, la producción de este gas representa para el rumiante hasta un 12 % de pérdida de la energía bruta del alimento (Beauchemin *et al.*, 2020).

### Efectos en el comportamiento productivo y características de la canal

A pesar de los potenciales efectos positivos sobre los parámetros de FR, el efecto de las zeolitas sobre el rendimiento en rumiantes no ha sido concluyente (Cuadro 2). Desde una perspectiva metabólica, las zeolitas no tienen un efecto directo sobre el rendimiento del ganado; sin embargo, al neutralizar el pH ruminal, proporcionan condiciones ruminales más favorables para un mejor desarrollo y actividad de las bacterias, y por consecuencia una mejora en la productividad animal. De acuerdo con esto, corderos (Deligiannis *et al.*, 2005; Norouzian *et al.*, 2010; Stojković *et al.*, 2012; Estrada-Angulo *et al.*, 2017; Abdelrahman *et al.*, 2021) de diferentes razas y novillos (Sherwood *et al.*, 2005) registraron mejores ganancias de peso y eficiencia alimenticia cuando fueron suplementados con CTL. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la suplementación con CTL no tiene efecto sobre el comportamiento productivo animal (McCullum y Galyean, 1983; Bosi *et al.*, 2002; Toprak *et al.*, 2016; Mahdavi *et al.*, 2021); no obstante, tampoco se ha reportado un efecto negativo sobre la producción, a excepción del estudio de Pond *et al.* (1984); En este trabajo se encontró una reducción en las ganancias de peso de los corderos suplementados con CTL y urea como fuente de NNP.

Por otro lado, los cambios en las características de la canal por efecto de la suplementación con CTL son limitados y además, los resultados encontrados hasta ahora son poco claros; algunos estudios reportan canales más magras y con una tendencia al aumento del área del ojo de costilla (Estrada-Angulo *et al.*, 2017; Coronel-Burgos *et al.*, 2017; Sallam *et al.*, 2022; Ghoneem *et al.*, 2022), mientras que otros autores no han observado efecto alguno en ninguna de las características de calidad de las canales (Pond *et al.*, 1984; Deligiannis *et al.*, 2005; Sherwood *et al.*, 2005) aun cuando los animales suplementados presentaron mejores ganancias de peso con respecto al grupo control. Una de las características de calidad de la canal de gran importancia económica es el rendimiento (relación entre el peso de la canal caliente y peso vivo del animal), y es bien conocido que se puede mejorar aumentando el nivel nutricional de la dieta (Alexandre *et al.*, 2009). En este sentido, la zeolita al ser un ingrediente que no tiene ningún aporte energético, disminuye la concentración de energía neta cuando es incluida en la dieta (Coronel-Burgos *et al.*, 2017; Estrada-Angulo *et al.*, 2017). Esta reducción de la densidad energética de la dieta puede reflejarse en una menor deposición de tejido muscular y grasa corporal en las canales de los animales suplementados, y por consecuencia en el rendimiento de éstas. Sin embargo, se requiere de más investigación para establecer si la CTL puede mejorar las características de las canales y además, aclarar las condiciones nutricionales de la dieta para una mejor utilización de la energía bajo una suplementación con este mineral.

Por otra parte, Khachlouf *et al.* (2018) recientemente realizaron un meta-análisis sobre los efectos en la producción y composición de la leche proveniente del ganado lechero suplementado con zeolita, principalmente CTL. El

**Cuadro 2:** Efectos en el comportamiento productivo y características de la canal de bovinos y ovinos suplementados con clinoptilolita.  
**Table 2:** Effects of dietary clinoptilolite on feedlot performance and carcass traits in bovines and ovines.

Tiempo de exposición y dosis empleada	Especie (n)	Efecto observado	Referencia
CTL al 0, 1.5 y 3 % por 6 sem	Ovinos Balouchi n = 30	↑ GDP	Norouzian <i>et al.</i> (2010)
Zeolita al 0, 30 y 60 g/d por 90 d	Ovinos Mehraban n = 48	↑ Consumo de alimento ↑NS CA y AOC ↓ Menor deposición de grasa dorsal	Forouzani <i>et al.</i> (2004)
CTL al 0, 1.5, 3 y 4.5 % por 75 d	Ovinos Kathadin x Pelibuey n = 40	↑ Masa magra ↓ grasa tisular y visceral T↑ AOC	Coronel-Burgos <i>et al.</i> (2017)
CTL 1 y 2 % por 90 d	Ovinos Barki n = 30	T↑ GDP y T↓ CA	Ghoneem <i>et al.</i> (2022)
Zeolita natural: 0, 20, 40 y 60 g/kg por 52 d	Ovinos Rambouillet n = 40	↑GDP y CA	Roque-Jiménez <i>et al.</i> (2018)
CTL: 0 y 3% por 3 meses	Ovinos Karagouniko n = 24	↑GDP y consumo de alimento Características de la canal sin cambio	Deligiannis <i>et al.</i> (2005)
CTL al 0, 1.5, 3 y 4.5 % por 75 d	Ovinos Kathadin x Pelibuey n = 40	↑CA Sin cambio en consumo de alimento	Estrada-Angulo <i>et al.</i> (2017)
CTL al 1.2 % por 168 d	Bovinos n = 96	↑NS GDP (3.4 %) y CA (2.8 %)	Sherwood <i>et al.</i> (2005)
CTL al 0, 1, 2 y 3 % por 56 d	Ovinos Kathadin x Pelibuey n = 40	Sin cambios en el comportamiento productivo ↓ Menor deposición de grasa dorsal	Estrada-Angulo <i>et al.</i> (2017)
CTL al 1 y 2 % por 56 d	Ovinos Naemi n = 24	↑ Ganancia total de peso y consumo de alimento	Abdelrahman <i>et al.</i> (2021)
Alimento a base de CTL	Ovinos n = 15	↑ Ganancia total de peso, GDP y CA ↓ Incidencia de diarreas	Stojkovic <i>et al.</i> (2012)
Aluminosilicato de sodio: 0 y 200 g/d por 100 d	Vacas Holstein n = 42	↑Producción de leche (+2.18 kg/vaca) Sin cambios en la composición química de la leche	Khachlouf <i>et al.</i> (2019)
CTL al 0, 150 y 300 g/d por 20 sem	Vacas Holstein n = 90	Sin cambios en la producción de leche	Marin <i>et al.</i> (2020)

T: Tendencia; GDP: Ganancia diaria de peso; NS: Resultado no significativo AOC: Área del ojo de costilla; CA: Conversión alimenticia

meta-análisis reveló un aumento en la producción de leche cuando las vacas son suplementadas con dosis entre los 200 y 300 g/d. Una mejora en el rendimiento de la leche puede ser resultado de una modificación en algunos de los parámetros de la FR como: un aumento en la producción de propionato, mejoras en la digestibilidad o una mayor síntesis de proteína microbiana (Marin *et al.*, 2020). No obstante, algunos autores no reportaron cambios en la producción de leche (Bosi *et al.*, 2002; Dschaak *et al.*, 2010; Khachlouf *et al.*, 2019); estas inconsistencias pueden estar relacionados a la dosis utilizada, la composición de la dieta o de la zeolita, consumo de alimento o el tamaño de partícula del alimento (Khachlouf *et al.*, 2018; Marin *et al.*, 2020).

Es importante resaltar que con respecto a la influencia en la calidad de la carne de rumiantes por la suplementación con CTL, hasta nuestra revisión se cuenta con muy poca información disponible en la literatura. No obstante, los resultados de un estudio reportan una mejora en el color de la carne de corderos suplementados con 1 % de CTL, principalmente en los parámetros L\*, a\* y C\*, además se observó una mejora en el perfil lipídico e índices nutricionales de la carne de los corderos suplementados (Tánori-Lozano *et al.*, 2022). Este último resultado, coincide con los cambios reportados en el perfil lipídico de la carne de aves suplementadas con CTL (Mallek *et al.*, 2012; Hcini *et al.*, 2018).

### Seguridad de la Clinoptilolita

Con respecto al uso de CTL, hasta el momento no se han reportado efectos tóxicos a su exposición durante períodos largos, incluso algunos estudios han encontrado resultados prometedores sobre la inhibición del desarrollo de células cancerígenas (Pavelić *et al.*, 2018; Eisenwagen y Pavelić, 2020). Recientemente se ha discutido la posibilidad de que ocurra una desorción de los metales pesados atrapados en las zeolitas cuando esta transita por el intestino; sin embargo, debido a la alta afinidad que tiene la CTL por los metales pesados, la adsorción es casi irreversible (Hamidpour *et al.*, 2010; Tondar *et al.*, 2014).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aprobó el uso de CTL como un aditivo seguro para utilizarse en la industria pecuaria a dosis de hasta 10,000 mg/kg. La CTL al ser un aditivo inerte, no se absorbe ni se degrada durante su paso por el tracto digestivo, por lo que es completamente excretada en las heces (FEEDAP, 2013). En ninguno de los estudios anteriores se reportaron efectos negativos sobre la productividad o salud de los animales que fueron suplementados con CTL. Por el contrario, la adición del mineral a la dieta contribuyó a su salud, disminuyendo el índice de diarreas o infecciones intramamarias (Deligiannis *et al.*, 2005; Norouzian *et al.*, 2010; Stojković *et al.*, 2012; Khachlouf *et al.*, 2019; Đuričić *et al.*, 2020), así como las concentraciones

de aflatoxinas (Katsoulos *et al.*, 2016) y de metales pesados (Khachlouf *et al.*, 2019) en la leche de vacas. Otra de las preocupaciones sobre el uso de zeolitas en la nutrición animal, es su potencial efecto de adsorber minerales o vitaminas esenciales, lo que a largo plazo pudiera provocar desbalances nutricionales y repercutir negativamente en la productividad animal. No obstante, varios estudios han mostrado que la suplementación con CTL no tuvo efectos adversos sobre las concentraciones séricas de Cu, Fe, Zn, Na, K, Ca, Mg y vitaminas A y E (Bosi *et al.*, 2002; Papaioannou *et al.*, 2002; Katsoulos *et al.*, 2005; Khachlouf *et al.*, 2019). Incluso, Khachlouf *et al.* (2019) reportaron un incremento en las concentraciones de Ca sanguíneo en las vacas suplementadas con 200 g/d de CTL en su etapa pre-parto y lactancia; este resultado sugiere que la inclusión de CTL en la dieta de las vacas podría reducir la incidencia de hipocalcemia post-parto.

### Conclusiones y perspectivas futuras

La continua preocupación por el riesgo a la salud humana y animal que representa el uso indiscriminado de los APC, aunado al necesario traslado hacia un sistema de producción sustentable con menor impacto ambiental, requiere la búsqueda de ingredientes con valor nutricional y/ o propiedades bioactivas que compitan con los promotores de crecimiento tradicionales. Sin embargo, hoy en día existen muchas preguntas e incertidumbre sobre el uso de estos ingredientes alternativos para implementarse rutinariamente en la producción animal, principalmente debido al desconocimiento sobre los beneficios que éstos compuestos pueden tener tanto en el aspecto económico, como productivo y ambiental. Por otro lado, el uso de productos de origen natural tiene poca aceptación por parte de los productores a causa de que los efectos de algunos de estos compuestos son moderados e incluso en algunos casos inconsistentes. Hasta el momento, según la información actual, el uso de CTL en la dieta de rumiantes pudiera ser una estrategia prometedora para la obtención de mejores resultados en la producción y calidad de carne y leche proveniente de rumiantes.

Los resultados presentados en esta revisión muestran el potencial que tiene la CTL en la producción animal, por lo cual se requiere realizar más investigaciones sobre el uso de este aditivo, con la finalidad de establecer las condiciones de dosificación, composición de la dieta y de la zeolita, así como el tamaño de partícula del mineral. Además, se requieren nuevos estudios sobre los efectos en la calidad de la carne de los rumiantes.

### REFERENCIAS

- Abdelrahman, M.M., Alhidary, I., Adeniji, Y.A., Alobre, M.M., Albaadani, H., y Aljumaah, R. 2021. Manipulating Phosphorus, Calcium, and Magnesium Utilization by Growing Lambs Using Natural Zeolite (Clinoptilolite). *Sustainability* 13:1539.
- Ahmaruzzaman, M. 2008. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: a review. *Advances in colloid and interface science* 143:48-67.
- Alexandre, G., Limea, L., Fanchonne, A., Coppry, O., Mandonnet, N., y Boval, M. 2009. Effect of forage feeding on goat meat production: carcass characteristics and composition of Creole kids reared either at pasture or indoors in the humid tropics. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 22:1140-50.
- Ambrozova, P., Kynicky, J., Urubek, T., y Nguyen, V.D. 2017. Synthesis and modification of clinoptilolite. *Molecules* 22:1107.
- Ames Jr, L. 1960. The cation sieve properties of clinoptilolite. *American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials* 45:689-700.
- Baldi, A., y Gottardo, D. 2017. Livestock Production to Feed the Planet: Animal Protein: A Forecast of Global Demand over the Next Years. *Rel.: Beyond Anthropocentrism* 5:65.
- Beauchemin, K.A., Ungerfeld, E.M., Eckard, R.J., y Wang, M. 2020. Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal* 14:s2-s16.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G., Colombatto, D., McAllister, T.A., y Beauchemin, K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology* 145:209-28.
- Bish, D.L., y Ming, D.W. 2001. Natural zeolites: Occurrence, properties, applications, vol. 45. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America, Chantilly, Virginia.
- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J., y Massé, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science* 84:319-35.
- Bosi, P., Creston, D., y Casini, L. 2002. Production performance of dairy cows after the dietary addition of clinoptilolite. *Italian Journal of Animal Science* 1:187-95.
- Castanon, J. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science* 86:2466-71.
- Cerri, G., Langella, A., Pansini, M., y Cappelletti, P. 2002. Methods of determining cation exchange capacities for clinoptilolite-rich rocks of the Logudoro region in northern Sardinia, Italy. *Clays and Clay Minerals* 50:127-35.
- Coombs, D.S., Alberti, A., Armbruster, T., Artioli, G., Colella, C., Galli, E., Grice, J.D., Liebau, F., Mandarino, J.A., et al. 1998. Recommended nomenclature for zeolite minerals: report of the subcommittee on zeolites of the International Mineralogical Association, Commission on New Minerals and Mineral Names. *Mineralogical Magazine* 62:533-71.
- Copcia, V.E., Luchian, C., Dunca, S., Bilba, N., y Hristodor, C.M. 2011. Antibacterial activity of silver-modified natural clinoptilolite. *Journal of materials science* 46:7121-28.
- Coronel-Burgos, F., Plascencia, A., Castro-Pérez, B., Contreras-Pérez, G., Barreras, A., y Estrada-Angulo, A. 2017. Influencia de la sustitución parcial del maíz y de la pasta de soja por zeolita en ovinos en etapa de finalización: Características de la canal, composición tisular y masa visceral. *Archivos de zootecnia* 66:223-28.
- Cursaru, B., Radu, A.-L., Perrin, F.-X., Sarbu, A., Teodorescu, M., Gavrilă, A.-M., Damian, C.-M., Sandu, T., Iordache, T.-V., et al. 2020. Poly (ethylene glycol) Composite Hydrogels with Natural Zeolite as Filler for Controlled Delivery Applications. *Macromolecular Research* 28:211-20.

- Dávila-Guzman, N.E., Cerino-Córdova, F.J., Diaz-Flores, P.E., Rangel-Mendez, J.R., Sánchez-González, M.N., y Soto-Regalado, E. 2012. Equilibrium and kinetic studies of ferulic acid adsorption by Amberlite XAD-16. *Chemical Engineering Journal* 183:112-16.
- Deligiannis, K., Lainas, T., Arsenos, G., Papadopoulos, E., Fortomaris, P., Kufidis, D., Stamataris, C., y Zygoyiannis, D. 2005. The effect of feeding clinoptilolite on food intake and performance of growing lambs infected or not with gastrointestinal nematodes. *Livestock Production Science* 96:195-203.
- Delkash, M., Bakhshayesh, B.E., y Kazemian, H. 2015. Using zeolitic adsorbents to cleanup special wastewater streams: A review. *Microporous and Mesoporous Materials* 214:224-41.
- Dennis, S., Nagaraja, T., y Bartley, E. 1981. Effect of lasalocid or monensin on lactate-producing or using rumen bacteria. *Journal of Animal Science* 52:418-26.
- Di Gregorio, M.C., Neeff, D.V.d., Jager, A.V., Corassin, C.H., Carão, Á.C.d.P., Albuquerque, R.d., Azevedo, A.C.d., y Oliveira, C.A.F. 2014. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Reviews* 33:125-35.
- Dibner, J.J., y Richards, J.D. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science* 84:634-43.
- Dschaak, C., Eun, J.-S., Young, A., Stott, R., y Peterson, S. 2010. Effects of supplementation of natural zeolite on intake, digestion, ruminal fermentation, and lactational performance of dairy cows. *The Professional Animal Scientist* 26:647-54.
- Đuričić, D., Sukalić, T., Marković, F., Kočila, P., Žura Žaja, I., Menčik, S., Dobranić, T., Benić, M., y Samarđžija, M. 2020. Effects of dietary vibroactivated clinoptilolite supplementation on the intramammary microbiological findings in dairy cows. *Animals* 10:202.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2013. Scientific Opinion on the safety and efficacy of clinoptilolite of sedimentary origin for all animal species. *EFSA Journal* 11:30-39.
- Eisenwagen, S., y Pavelic, K. 2020. Potential Role of Zeolites in Rehabilitation of Cancer Patients. *Archives of Physiotherapy and Rehabilitation* 3:29-40.
- El-Nile, A., Elazab, M., El-Zaiat, H., El-Azrak, K.E.-D., Elkomy, A., Sallam, S., y Soltan, Y. 2021. In vitro and in vivo assessment of dietary supplementation of both natural or nano-zeolite in goat diets: Effects on ruminal fermentation and nutrients digestibility. *Animals* 11:2215.
- Erwanto, E., Zakaria, W.A., y Prayuwidayati, M. 2011. The use of ammoniated zeolite to improve rumen metabolism in ruminant. *Animal Production* 13.
- Estrada-Angulo, A., Burgos, F.C., Pérez, B.C., Soto, M.L., Barreras, A., Montoya, C.A., Pérez, G.C., y Plascencia, A. 2017. Efecto de la inclusión de zeolita (clinoptilolita) en ovinos en etapa de finalización: Respuesta productiva y energética de la dieta. *Archivos de zootecnia* 66:381-86.
- Estrada-Angulo, A., Urías-Estrada, J.D., Castro-Pérez, B.I., Contreras-Pérez, G., Angulo-Montoya, C., Barreras, A., López-Soto, M.A., Olivas-Valdez, J.A., y Plascencia, A. 2017. Impact of dietary inclusion of clinoptilolite as substitute of soybean meal on growth performance, dietary energetics and carcass traits of feedlot ewes fed a corn-based diet. *Austral journal of veterinary sciences* 49:123-28.
- Fanta, F.T., Dubale, A.A., Bebizuh, D.F., y Atlabachew, M. 2019. Copper doped zeolite composite for antimicrobial activity and heavy metal removal from waste water. *BMC chemistry* 13:1-12.
- Forouzani, R., Rowghani, E., y Zamiri, M.J. 2004. The effect of zeolite on digestibility and feedlot performance of Mehraban male lambs given a diet containing urea-treated maize silage. *Animal Science* 78:179-84.
- Galindo, J., Elias, A., y Cordero, J. 1982. The addition of zeolite to silage diets. 1. Effect of the zeolite level on the rumen cellulolysis of cows fed silage. *Cuban Journal of Agricultural Science* 16:277-84.
- Galindo, J., Elias, A., y Gonzalez, M. 1986. The effect of zeolite on ruminal bacteria population and its activity in heifers fed sunflower: sorghum silage, *Studies in Surface Science and Catalysis*. Elsevier, pp. 1055-59.
- Gaskins, H., Collier, C., y Anderson, D. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal biotechnology* 13:29-42.
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., y Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*.
- Ghaemnia, L., Bojarpour, M., Mirzadeh, K.H., Chaji, M., y Eslami, M. 2010. Effects of Different Levels of Zeolite on Digestibility. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9:779-81.
- Ghoneem, W.M., El-Tanany, R.R., y Mahmoud, A.E. 2022. Effect of Natural Zeolite as a Rumen Buffer on Growth Performance and Nitrogen Utilization of Barki Lambs. *Pakistan J. Zool* 54:199-207.
- Goodarzi, M., y Nanekarani, S. 2012. The effects of calcic and potassic clinoptilolite on ruminal parameters in Lori breed sheep. *APCBEE Procedia* 4:140-45.
- Hagiwara, Z., Hoshino, S., Ishino, H., Nohara, S., Tagawa, K., y Yamanaka, K. 2011. United States Patent No 4 911 898. Retrieved on January.
- Hamidpour, M., Kalbasi, M., Afyuni, M., Shariatmadari, H., Holm, P.E., y Hansen, H.C.B. 2010. Sorption hysteresis of Cd (II) and Pb (II) on natural zeolite and bentonite. *Journal of hazardous materials* 181:686-91.
- Hcini, E., Ben Slima, A., Kallel, I., Zormati, S., Traore, A.I., y Gdoura, R. 2018. Does supplemental zeolite (clinoptilolite) affect growth performance, meat texture, oxidative stress and production of polyunsaturated fatty acid of Turkey poult? *Lipids in health and disease* 17:1-9.
- Jha, B., y Singh, D.N. 2016. Fly ash zeolites. *Advanced Structured Materials* 78:5-31.
- Kammerer, D.R., Kammerer, J., y Carle, R. 2019. Adsorption and Ion Exchange for the Recovery and Fractionation of Polyphenols: Principles and Applications, *Polyphenols in Plants*. Elsevier, pp. 327-39.
- Karatzia, M.A., Pourliotis, K., Katsoulos, P.D., y Karatzias, H. 2011. Effects of in-feed inclusion of clinoptilolite on blood serum concentrations of aluminium and inorganic phosphorus and on ruminal pH and volatile fatty acid concentrations in dairy cows. *Biological trace element research* 142:159-66.
- Kardaya, D., Sudrajat, D., y Dihansih, E. 2012. Efficacy of dietary urea-impregnated zeolite in improving rumen fermentation characteristics of local lamb. *Media Peternakan* 35:207-07.



- Katsoulos, P.D., Karatzia, M.A., Boscós, C., Wolf, P., y Karatzias, H. 2016. In-field evaluation of clinoptilolite feeding efficacy on the reduction of milk aflatoxin M1 concentration in dairy cattle. *Journal of animal science and technology* 58:1-7.
- Katsoulos, P.-D., Roubies, N., Panousis, N., y Karatzias, H. 2005. Effects of long-term feeding dairy cows on a diet supplemented with clinoptilolite on certain serum trace elements. *Biological trace element research* 108:137-45.
- Khachlouf, K., Hamed, H., Gdoura, R., y Gargouri, A. 2018. Effects of zeolite supplementation on dairy cow production and ruminal parameters—a review. *Annals of Animal Science* 18:857-77
- Khachlouf, K., Hamed, H., Gdoura, R., y Gargouri, A. 2019. Effects of dietary Zeolite supplementation on milk yield and composition and blood minerals status in lactating dairy cows. *Journal of Applied Animal Research*.
- Kraljević Pavelić, S., Simović Medica, J., Gumbarević, D., Filošević, A., Pržulj, N., y Pavelić, K. 2018. Critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applications in vivo. *Frontiers in pharmacology*:1350.
- Król, M. 2020. Natural vs. synthetic zeolites. *Crystals* 10:622.
- Kyriakis, S.C., Papaioannou, D.S., Alexopoulos, C., Polizopoulou, Z., Tzika, E.D., y Kyriakis, C.S. 2002. Experimental studies on safety and efficacy of the dietary use of a clinoptilolite-rich tuff in sows: a review of recent research in Greece. *Microporous and Mesoporous Materials* 51:65-74.
- Laza-knoerr, A.L., y Dumargue, P. 2020. Urea supplement for animal nutrition. Google Patents.
- Li, Y., Li, L., y Yu, J. 2017. Applications of zeolites in sustainable chemistry. *Chem* 3:928-49.
- Mahdavarad, N., Chaji, M., Bojarpour, M., y Dehghanbanadaky, M. 2021. Comparison of the effect of sodium bicarbonate, sodium sesquicarbonate, and zeolite as rumen buffers on apparent digestibility, growth performance, and rumen fermentation parameters of Arabi lambs. *Tropical Animal Health and Production* 53:1-12.
- Mallek Z, Fendri I, Khannous L, Ben Hassena A, Traore AI, Ayadi M-A, et al. 2012. Effect of zeolite (clinoptilolite) as feed additive in Tunisian broilers on the total flora, meat texture and the production of omega 3 polyunsaturated fatty acid. *Lipids in health and disease*. 11(1):1-7.
- Marin, M.P., Pogurschi, E.N., Marin, I., y Nicolae, C.G. 2020. Influence of natural zeolites supplemented with inorganic selenium on the productive performance of dairy cows. *Pakistan journal of zoology* 52:775.
- Martins, G.N., Spínola, V., y Castilho, P.C. 2020. Release of adsorbed ferulic acid in simulated gastrointestinal conditions. *European Food Research and Technology* 246:1297-306.
- Mathew, A.G., Cissell, R., y Liamthong, S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne pathogens and disease* 4:115-33
- McCollum, F.T., y Galyean, M.L. 1983. Effects of clinoptilolite on rumen fermentation, digestion and feedlot performance in beef steers fed high concentrate diets. *Journal of Animal Science* 56:517-24.
- Meschiatti, M.A., Gouvêa, V.N., Pellarin, L.A., Batalha, C.D., Biehl, M.V., Acedo, T.S., Dórea, J.R., Tamassia, L.F., Owens, F.N., et al. 2019. Feeding the combination of essential oils and exogenous  $\alpha$ -amylase increases performance and carcass production of finishing beef cattle. *Journal of Animal Science* 97:456-71.
- Milenkovic, J., Hrenovic, J., Matijasevic, D., Niksic, M., y Rajic, N. 2017. Bactericidal activity of Cu-, Zn-, and Ag-containing zeolites toward *Escherichia coli* isolates. *Environmental Science and Pollution Research* 24:20273-81.
- Montes-Luna, A.d.J., Fuentes-López, N., Perera-Mercado, Y., Pérez-Camacho, O., Castruita-de León, G., García-Rodríguez, S., y García-Zamora, M. 2015. Caracterización de clinoptilolita natural y modificada con  $\text{Ca}^{2+}$  por distintos métodos físico-químicos para su posible aplicación en procesos de separación de gases. *Superficies y vacío* 28:5-11.
- Mumpton, F. 1998. *The role of natural zeolites in agriculture and aquaculture, Zeo-Agriculture*. Westview Press, Boulder, Colorado.
- Norouzian, M., Valizadeh, R., Khadem, A., Afzalzadeh, A., y Nabipour, A. 2010. The effects of feeding clinoptilolite on hematology, performance, and health of newborn lambs. *Biological trace element research* 137:168-76.
- Papaioannou, D.S., Kyriakis, S.C., Papasteriadis, A., Roubies, N., Yannakopoulos, A., y Alexopoulos, C. 2002. Effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on certain vitamin, macro and trace element concentrations in the blood, liver and kidney tissues of sows. *Research in veterinary science* 72:61-68.
- Patra, A.K., y Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:363-75.
- Peña-Torres, E.F., González-Ríos, H., Avendaño-Reyes, L., Valenzuela-Grijalva, N.V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazán, A., y Peña-Ramos, E.A. 2019. Ácidos hidroxilicinos en producción animal: farmacocinética, farmacodinamia y sus efectos como promotor de crecimiento. *Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias* 10:391-415.
- Pond, W., Laurent, S., y Orloff, H. 1984. Effect of dietary clinoptilolite or zeolite Na-A on body weight gain and feed utilization of growing lambs fed urea or intact protein as a nitrogen supplement. *Zeolites* 4:127-32.
- Pond, W.G., y Mumpton, F.A. 1984. *Zeo-agriculture: Use of natural zeolites in agriculture and aquaculture*. Westview press.
- Roque-Jiménez, J.A., Pinos-Rodríguez, J.M., Rojo-Rub, R., Mendoza, G.D., Vazquez, A., De Jesus, J.A.C., y Lee-Rangel, H.A. 2018. Effect of natural zeolite on live weight changes, ruminal fermentation and nitrogen metabolism of ewe lambs. *South African Journal of Animal Science* 48.
- Rostami, R., y Jonidi Jafari, A. 2014. Application of an adsorptive-thermocatalytic process for BTX removal from polluted air flow. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 12:1-10.
- Ruiz, O., Castillo, Y., Miranda, M.T., Elías, A., Arzola, C., Rodríguez, C., y La, O. 2007. Niveles de zeolita y sus efectos en indicadores de la fermentación ruminal en ovinos alimentados con heno de alfalfa y concentrado. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 41:253-57.
- Sadeghi, A., y Shawrang, P. 2006. The effect of natural zeolite on nutrient digestibility, carcass traits and performance of Holstein steers given a diet containing urea. *Animal Science* 82:163-67.
- Sallam, S.M., Abo-Zeid, H.M., Abaza, M.A., y El-Zaiat, H.M., 2022. Nutrient intake, digestibility, growth performance, and carcass of sheep fed urea-based diet supplemented with natural clinoptilolite. *Animal Science Journal* 93:e13689.

- Servatan, M., Zarrintaj, P., Mahmodi, G., Kim, S.-J., Ganjali, M.R., Saeb, M.R., y Mozafari, M. 2020. Zeolites in drug delivery: Progress, challenges and opportunities. *Drug Discovery Today* 25:642-56.
- Sherwood, D.M., Erickson, G.E., y Klopfenstein, T.J. 2005. Effect of clinoptilolite zeolite on cattle performance and nitrogen volatilization loss. *Nebraska Beef Cattle Reports*:177.
- Song, Z., Huang, Y., Xu, W.L., Wang, L., Bao, Y., Li, S., y Yu, M. 2015. Continuously adjustable, molecular-sieving "gate" on 5A zeolite for distinguishing small organic molecules by size. *Scientific reports* 5:1-7.
- Spears, J.W., 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Animal feed science and technology* 58:151-63.
- Stojković, J., Ilić, Z.Z., Ćirić, S., Ristanović, B., Petrović, M.P., Caro Petrović, V., y Kurcubic, V.S. 2012. Efficiency of zeolite basis preparation in fattening lambs diet. *Biotechnology in Animal Husbandry* 28:545-52.
- Tánori-Lozano, A., Quintana-Romandía, A.I., Montalvo-Corral, M., Pinelli-Saavedra, A., Valenzuela-Melendres, M., Dávila-Ramírez, J.L., Islava-Lagarda, T.Y., y González-Ríos, H. 2022. Influence of ferulic acid and clinoptilolite supplementation on growth performance, carcass, meat quality, and fatty acid profile of finished lambs. *Journal of Animal Science and Technology* 64:274-90.
- Thiel, A., Tippkötter, N., Suck, K., Sohling, U., Ruf, F., y Ulber, R. 2013. New zeolite adsorbents for downstream processing of polyphenols from renewable resources. *Engineering in Life Sciences* 13:239-46.
- Tondar, M., Parsa, M.J., Yousefpour, Y., Sharifi, A.M., y Shetab-Boushehri, S.V. 2014. Feasibility of clinoptilolite application as a microporous carrier for pH-controlled oral delivery of aspirin. *Acta Chimica Slovenica* 61:688-93.
- Toprak, N., Yilmaz, A., Öztürk, E., Yigit, O., y Cedden, F. 2016. Effect of micronized zeolite addition to lamb concentrate feeds on growth performance and some blood chemistry and metabolites. *South African Journal of Animal Science* 46:313-20.
- Urías-Estrada, J.D., López-Soto, M.A., Barreras, A., Aguilar-Hernández, J.A., González-Vizcarra, V.M., Estrada-Angulo, A., Zinn, R.A., Mendoza, G.D., y Plascencia, A. 2017. Influence of zeolite (clinoptilolite) supplementation on characteristics of digestion and ruminal fermentation of steers fed a steam-flaked corn-based finishing diet. *Animal Production Science* 58:1239-45.
- Valpotić, H., Gračner, D., Turk, R., Đuričić, D., Vince, S., Folnožić, I., Lojkić, M., Žura Žaja, I., Bedrica, L., et al. 2017. Zeolite clinoptilolite nanoporous feed additive for animals of veterinary importance: potentials and limitations. *Periodicum biologorum* 119:159-72.
- Valpotic, H., Terzic, S., Vince, S., Samardzija, M., Turk, R., Lackovic, G., Habrun, B., Djuricic, D., Sadikovic, M., et al. 2016. In-feed supplementation of clinoptilolite favourably modulates intestinal and systemic immunity and some production parameters in weaned pigs. *Veterinárni medicína* 61:317-27.
- Weitkamp, J., y Puppe, L. 1999. Catalysis and zeolites: fundamentals and applications. Springer Science & Business Media.
- White, J.L., y Ohlrogge, A.J. 1983. Ion exchange materials to increase consumption of non-protein nitrogen by ruminants. Google Patents.
- Wu, Q.J., Wang, L.C., Zhou, Y.M., Zhang, J.F., y Wang, T. 2013. Effects of clinoptilolite and modified clinoptilolite on the growth performance, intestinal microflora, and gut parameters of broilers. *Poultry Science* 92:684-92.
- Yuna, Z. 2016. Review of the natural, modified, and synthetic zeolites for heavy metals removal from wastewater. *Environmental Engineering Science* 33:443-54.
- Zayed, M.S., Szumacher-Strabel, M., El-Fattah, D.A.A., Madkour, M.A., Gogulski, M., Stropfiová, V., Cieślak, A., y El-Bordeny, N.E. 2020. Evaluation of cellulolytic exogenous enzyme-containing microbial inoculants as feed additives for ruminant rations composed of low-quality roughage. *The Journal of Agricultural Science* 158:326-38.



# Polyphenolic-rich extracts from *Ilex paraguariensis* and *Larrea divaricata* leaves and their antioxidant and antiCOVID-19 potential

Extractos polifenólicos de las hojas de *Ilex paraguariensis* y *Larrea divaricata* y su potencial antioxidante y antiCOVID-19

Juan C. Contreras-Esquivel<sup>1</sup>, Carlos N. Cano-González<sup>1</sup>, Juan Ascacio-Valdes<sup>1</sup>, Jorge A. Aguirre-Joya<sup>2</sup>, David Aguillón-Gutiérrez<sup>2</sup>, Javier Breccia<sup>3</sup>, Judith D. Espinoza-Perez<sup>4</sup>, Cristóbal N. Aguilar<sup>1</sup>, and Cristian Torres-León<sup>2\*1</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo, Saltillo, Coahuila, 25280, Mexico

<sup>2</sup> Research Center and Ethnobiological Garden, Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Torreón, Viesca, Coahuila, 27480, Mexico

<sup>3</sup> INCITAP-Institute of Earth and Environmental Sciences of La Pampa (CONICET-UNLPam) National Scientific and Technical Research Council-National, University of La Pampa, Santa Rosa, La Pampa, 6300, Argentina

<sup>4</sup> Coyotefoods. Simon Bolivar 851A, Saltillo, Coahuila, Mexico.

## ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St. Hil) and jarilla (*Larrea divaricata* Cav.) leaves are commonly used as tea infusions in some Latin American countries. This study was conducted to evaluate the antioxidant activity (FRAP, ABTS, and DPPH) and the inhibitory potential of yerba mate and jarilla extracts on the 3CL protease (Mpro) from coronavirus SARS-COV-2 by a molecular docking approach. The main bioactive compounds present in the plant extracts were identified by HPLC-MS. According to the results, the extracts of yerba mate and jarilla showed high antioxidant activity in DPPH (> 91 %), ABTS (> 90 %), and FRAP (> 47 mg TE/g) assays. Additionally, the phenolic compounds present in yerba mate, quercetin-3-O-rutinoside (rutin) (-9.60 kcal/mol) and 3,4-dicaffeoylquinic acid (- 8.20 kcal/mol) were more effective on Mpro than the antiviral drugs remdesivir and ribavirin. The compounds rutin and 3,4-dicaffeoylquinic acid have a high affinity and interaction with one of the catalytic residues Cys145 of Mpro. The glycosylation of phenolic compounds affects biological activities: positively anti-COVID-19 and negatively antioxidant. The results suggest that extracts of yerba mate and jarilla leaves could enhance the body's antioxidant defenses and can be used to improve health.

**Keywords:** COVID-19, phenolic compounds, *Ilex paraguariensis*, antioxidant activity, molecular docking.

## RESUMEN

Las hojas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St. Hil) y jarilla (*Larrea divaricata* Cav.) se usan comúnmente como infusión de té en algunos países de América Latina. Este estudio se realizó para evaluar la actividad antioxidante (FRAP, ABTS y DPPH) y el potencial inhibitorio de los extractos de yerba mate y jarilla sobre la proteasa 3CL (Mpro) de coronavirus SARS-COV-2 por enfoque de acoplamiento molecular. Los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos de plantas fueron identificados por HPLC-MS. De acuerdo con los resultados, los extractos polifenólicos de yerba mate y jarilla presentaron alta actividad antioxidante

en los ensayos DPPH (> 91 %), ABTS (> 90 %) y FRAP (> 47 mg TE/g). Además, los compuestos fenólicos presentes en la yerba mate, quercetina-3-O-rutinósido (rutina) (-9,60 kcal/mol) y ácido 3,4-dicafeoilquinico (- 8,20 kcal/mol) han demostrado ser más efectivos (en Mpro) que los medicamentos antivirales remdesivir y ribavirin. Los compuestos rutina y ácido 3,4-dicafeoilquinico tienen alta afinidad e interacción con uno de los residuos catalíticos Cys145 de Mpro. Estos resultados sugieren que las hojas de yerba mate y jarilla podrían potenciar las defensas antioxidantes del organismo y podrían beneficiar la salud.

**Palabras clave:** COVID-19, compuestos fenólicos, *Ilex paraguariensis*, actividad antioxidante, acoplamiento molecular.

## INTRODUCTION

Natural products, especially medicinal plants and their phytochemicals, have been used for the treatment of various diseases since long time ago. They could be efficacious sources for prevention and treatment of diseases with new approaches, since approximately 60 % of the new medicines produced since 1981 come from plants (Newman and Cragg, 2020).

Medicinal plants have great potential in the prevention and treatment of infectious diseases. Despite the lack of strong evidence-based medicine, plants used in traditional medicine in many countries may have to contribute to the control of COVID-19 (Chen *et al.*, 2020). Medicinal plants are rich in bioactive compounds such as phenolic or polyphenolic compounds; these molecules are secondary metabolites of plants that have biological properties such as antioxidant (which helps to increase defenses) and antiviral activities (Torres-León *et al.*, 2017b) 2,3,4,6-Penta-O-Galloyl-β-D-Glucose (PGG). For example, bioactive compounds of traditional Mongolian medicine showed high anti-COVID-19 potential (Yu *et al.*, 2020) ETCM database and document mining methods were used to collect active compounds. Swiss TargetPrediction and SuperPred server were used to find targets of compounds with smiles number. Drugbank and Genecard database were used to collect antiviral drug targets. Then

\*Autor para correspondencia: Prof. Cristian Torres León  
 Correo electrónico: [ctorresleon@uadec.edu.mx](mailto:ctorresleon@uadec.edu.mx)

Recibido: 1 de junio de 2022

Aceptado: 3 de septiembre de 2022

the above targets were compared and analyzed to screen out antiviral targets of Mongolia medicine. Metascape database platform was used to enrich and analyze the GO (Gene ontology). The antioxidant activity of phenolic compounds depends on the number of hydroxyl and methoxy groups present in the ring and its structural dispositions that generate stabilized free radicals (Olszowy, 2019).

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St. Hil) is a plant typical of subtropical and native regions of South America, with their leaves commonly used to produce tea infusions. Schinella *et al.* (2000), have suggested that the ingestion of yerba mate leaves is an effective and economic way to increase the antioxidant defenses. Pharmacological properties attributed to yerba mate have been related to its high content of polyphenolic compounds (Colpo *et al.*, 2016).

Jarilla (*Larrea divaricata* Cav.) is another medicinal plant of interest in Latin America. This plant is commonly known as creosote bush, and it is widely used in folk medicine, mainly in Argentina and Mexico (Agüero *et al.*, 2011).

These plants can be promising sources of phenolic compounds. However, the evaluation of antiviral activity against the COVID-19 protease (Mpro) has not been evaluated. Mpro is essential for virus replication and is in the life cycle of the coronavirus (Gimeno *et al.*, 2020) the scientific community has been under pressure to react and make progress in the development of an effective treatment against the virus responsible for the disease. Here, we implement an original virtual screening (VS. Kong *et al.* 2020a) recently introduced a docking server for docking molecules against potential targets Mpro of COVID-19. Molecular docking is an *in silico* technique for predicting the binding ability and binding mode of a protein and molecules (ligands) based on the geometry. There are two parameters to evaluate a better docking, a docking score and the type of interaction. Computational analysis has a primary role in the early drug discovery process (Kulkarni *et al.*, 2020). Therefore, the aim of this study was to evaluate the antioxidant activity *in vitro* and anti-covid potential of the bioactive compounds of yerba mate and jarilla on Mpro.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant materials

Dried yerba mate (*I. paraguariensis* A.St. Hil) with leaf grinded and stems (1 kg package of Playadito con palo) was obtained from Cooperativa Agrícola de la Colonia Liebig Ltda. (Colonia Liebig's, Corrientes, Argentina). Dried jarilla (*L. divaricata* Cav.) leaf grinded (0.5 kg package) was purchased from Homeopathic Argentinian Pharmacy (60<sup>th</sup> avenue and 10<sup>th</sup> corner, La Plata, Buenos Aires, Argentina).

### Polyphenolic extracts

Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) (Branson, St. Louis, MO, USA) was performed according to Cárdenas-Hernández *et al.* (2020). Briefly, a 1 g sample of the plant was weighed and diluted in 20 mL of ethanol (90 %, v/v). The extraction was performed for 20 min at 35 °C (frequency: 60 Hz and power: 42 KHz). Samples were transferred to conical

tubes and taken to a centrifuge (SORVALL: Biofuge primo™ R) at 3500 x *g* at 20 °C (10 min). Subsequently, filtration of each sample was carried out (11 µm through filter paper) and the extracts were stored at -5 °C. The extraction yield was calculated by weight difference. Briefly, an extract of 5 mL was evaporated at room temperature (28 °C). The weight of the residue was multiplied by 4 to normalize the real volume of the experiment (20 mL).

### Antioxidant activity

The antioxidant activity in the ethanol extracts was determined by: DPPH• (Molyneux, 2004), ABTS•+ (Re *et al.*, 1999), and FRAP (Benzie and Strain, 1996). Each sample was measured in triplicate. The results of DPPH• and ABTS•+ tests were expressed as a percentage reduction. FRAP assay was expressed as Trolox Equivalents (TE) with a calibration curve of Trolox (0.1–1.0 mg/mL).

### Analytical RP-HPLC-ESI-MS

A Varian High-Performance Liquid Chromatography coupled to a mass spectrophotometer (Varian 500-MS IT Mass Spectrometer, USA; PDA detector Varian Pro Star 330, USA) was used to identify the main components in the extract according to Torres-León *et al.* (2017). Samples (5 µL) were injected into a Denali C18 column (150 mm × 2.1 mm, 3 µm, Grace, USA). The thermostat temperature was maintained at 30 °C. The eluents were as follows: formic acid (0.2%, v/v; A solvent) and acetonitrile (B solvent). The gradient was characterized by using initial, 3 % B with retention time of 0 – 5min, 9 % B linear with retention time of 5 – 15min, 16 % B linear with retention time of 15 – 45min, 50 % B linear.

### Determination of physicochemical parameters of the main protease (Mpro)

Main Protease (Mpro; 6WQF\_A) was taken from the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Analysis of the physical parameters of main protease (Mpro) is done by studying the number of amino acids and their composition, molecular weight, aliphatic index, theoretical pI, extinction coefficient, instability index, and grand average of hydrophobicity using ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam>).

### Molecular docking

A docking Server was used to predict the binding between the phytochemicals of yerba mate and jarilla extracts and the main COVID-19 protease (Mpro) (Torres-León *et al.*, 2020) (<https://ncov.schnglab.org.cn/index.php>), which is also named chymotrypsin-like protease (3CLpro) (Kong *et al.*, 2020b). The structures of bioactive compounds identified by the HPLC-MS analysis (used as ligands) were downloaded in SDF file format from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. The verified inhibitors were evaluated as positive controls (Remdesivir and Ribavirin). The main aim of this molecular interaction study was to identify the phytochemicals interacting with the crystal structure of protease (Mpro) *in silico*. All interaction visualization analysis studies were performed with the PyMol molecular visualization tool.



### Statistical analysis

Results were expressed as mean values  $\pm$  SD. The student's t-test was run to determine significant differences ( $p < 0.05$ ). All statistical determinations were performed using Statistica 7.0 software (StatSoft, Tulsa OK, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the extraction yield of yerba mate and jarilla leaves. The extraction yields (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) did not present a significant difference between the plants studied ( $p > 0.05$ ). The results obtained for yerba mate are similar to a previous report (12 %) (Jacques *et al.*, 2007). These authors recommended UAE instead of maceration due to the considerable gain in time and enhanced extraction efficiency. The jarilla extraction yield was higher than that reported (2.9 %) by Aguirre-Joya *et al.* (2018).

**Table 1.** Extraction yields and antioxidant potential of *Ilex paraguariensis* A.St. Hil and *Larrea divaricata* Cav extracts.

**Tabla 1.** Rendimientos de extracción y potencial antioxidante de extractos de *Ilex paraguariensis* A.St. Hil y *Larrea divaricata* Cav.

Analysis	<i>Ilex paraguariensis</i> A.St. Hil	<i>Larrea divaricata</i> Cav.
Extraction yield (%)	12.0 $\pm$ 0.46	12.8 $\pm$ 0.57
DPPH (%)	91.5 $\pm$ 0.11	92.4 $\pm$ 0.56
ABTS+ (%)	90.5 $\pm$ 1.10	93.0 $\pm$ 0.78*
FRAP (mg TE/g)	47.6 $\pm$ 4.00	108.0 $\pm$ 5.88*

Values are presented as means  $\pm$  SD (n = 3). \*Significantly different by t-test ( $p < 0.05$ ).

### Antioxidant activity

The results of the DPPH assay (Table 1) showed that both extracts have a high antioxidant activity ( $> 90$  %); without presenting a significant difference between the plants. These results were similar (92 %) to those reported in *Larrea* genus (Aguirre-Joya *et al.*, 2018) and higher than those reported in yerba mate leaves from Brazil, Argentina, and Uruguay ( $< 80$  %) (Colpo *et al.*, 2016). The results in the ABTS+ assay also showed high antioxidant activity in both samples ( $> 90$  %). Extracts of jarilla (93 %) were significantly higher than those of yerba mate (90.5 %). Finally, the FRAP analysis showed that the extracts were able to reduce the ferric ion to ferrous ion. The jarilla extract showed a high antioxidant activity, significantly higher than yerba mate ( $p > 0.05$ ). This trend was similar in the ABTS+ test; these assays are associated with its ability to scavenge free radicals. The results showed that yerba mate and jarilla leaves have high antioxidant activity. This biological activity is attributed to the presence of bioactive compounds such as polyphenols. The antioxidant activity of phenolic compounds depends on the number of hydroxyl and methoxy groups present in the ring and their dispositions in its structure. Generally, glycosylation of 3-hydroxyl groups reduces the antioxidant properties of compounds. For this reason, yerba mate has less antioxidant activity due to the presence of rutin (Olszowy, 2019). The

consumption of these plants can increase the antioxidant defenses in people (Schinella *et al.*, 2000).

### Analytical RP-HPLC-ESI-MS

The identification of phenolic compounds of yerba mate and jarilla extracts was performed by comparing the retention time by HPLC analysis with MS. The molecular weight was compared with the literature and the database of the Food Research Department (DIA-UAdeC). In this study, four phenolic compounds were separated and identified in each extract (Table 2). In general, yerba mate extract contained neochlorogenic acid, chlorogenic acid, rutin, and 3,4-dicaffeoylquinic acid. Chlorogenic acid is a compound that derives from caffeic acid and is present in higher concentrations in yerba mate extract. Thus corroborating the results presented in the literature (Agüero *et al.*, 2011; Zapata *et al.*, 2019).

The HPLC-MS analysis showed that jarilla leaves are a source of 3'-O-methyl-nordihydroguaiaretic acid, *p*-hydroxybenzoyl glucoside, meso (rel7S,8S,7'R,8'R)-3,4,3',4'-tetrahydroxy-7,7'-epoxylignan and nordihydroguaiaretic acid. These lignans and others have been previously reported in *Larrea* spp. extracts (Agüero *et al.*, 2011; Vargas-Arispuro *et al.*, 2005) nordihydroguaiaretic acid (NDGA). Variations in the phenolic profile may be due to factors such as the extraction method or growing conditions of the plants.

### Determination of physicochemical parameters of the main protease (Mpro)

The main protease (Mpro) structure is composed of the I, II, and III domains (Kneller *et al.*, 2020); residues 8 – 10, 102 – 184, and 201 – 303, respectively. The number of amino acids is 306. In the present study, the theoretical isoelectric point (pI) was 5.92 – 5.95. The molecular weight of the protein is 33796.64 Da. The instability index is 27.65; a value  $< 40$  indicates that the protein structure is stable. The average extinction coefficient is 33640. The aliphatic index is 82.12. The GRAVY value was - 0.019, this value indicates that the protein is hydrophilic and non-polar.

### Molecular docking

The application of the COVID-19 docking server elucidated the interactions between the lead-likeness compounds and Mpro (Table 2).

All the identified compounds in the yerba mate and jarilla leaves extracts showed an inhibitory potential against Mpro. According to *in silico* results, all the compounds had a higher affinity against COVID-19 protease ( $< - 7.20$  kcal/mol) than Ribavirin (- 6.40 kcal/mol). Additionally, the yerba mate compounds, rutin (-9.60 kcal/mol), and 3,4-dicaffeoylquinic acid (- 8.20 kcal/mol) had a high affinity that the broad spectrum anti-viral drug Remdesivir (- 8.10 kcal/mol). This molecule has anti-Covid19 activity (Singh *et al.*, 2020) and is currently used in COVID-19 management (Hung *et al.*, 2020). The docking energy is lower, and the binding is more stable, which indicates that yerba mate molecules probably

**Table 2.** Identification of the main *Ilex paraguariensis* A.St. Hil and *Larrea divaricata* Cav. compounds and their Mpro binding affinity.

**Tabla 2.** Identificación de los principales compuestos de *Ilex paraguariensis* A.St. Hil y *Larrea divaricata* Cav. y su afinidad vinculante contra Mpro.

Material	HPLC-MS			Reference	Mpro Docking Score	
	TR (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Name		PubChem	(kcal/mol)
Control	-	-	Remdesivir	-	121304016	- 8.10
Control	-	-	Ribavirin	-	37542	- 6.40
<i>Ilex paraguariensis</i> A.St. Hil	20.16	353	5-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid)	(Zapata <i>et al.</i> , 2019)	241164669	- 7.80
	25.86	353.1	3-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)	(Zapata <i>et al.</i> , 2019)	1794427	- 7.20
	34.88	609.1	Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)	(Perestrelo <i>et al.</i> , 2012)	5280805	- 9.60
	37.18	515.1	3,4-dicaffeoylquinic acid	(Zapata <i>et al.</i> , 2019)	5281780	- 8.20
<i>Larrea divaricata</i> Cav.	47.91	315	3'methyl-nordihydroguaiaretic acid	(Agüero <i>et al.</i> , 2011)	122821	- 7.60
	51.45	299	p-Hydroxybenzoyl glucoside	(Perestrelo <i>et al.</i> , 2012)	-	-
	52.59	329	meso-(rel 7S,8S,7'R,8'R)-3,4,3',4'-tetrahydroxy-7,7'-epoxylignan	(Agüero <i>et al.</i> , 2011)	-	-
	54.91	301.1	Nordihydroguaiaretic acid	(Agüero <i>et al.</i> , 2011)	4534	- 7.60

hinder the binding of substrate proteins more effectively. Das *et al.* (2020) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2, reported that rutin could bind Mpro protein (PDB: 6Y84) with the highest affinity among 33 molecules screened (including natural products, antivirals, antifungals, and antiprotozoal agents). Furthermore, the docking energy of the rutin derivatives was determined for isoquercetin (monoglycosylated) and quercetin (deglycosylated), resulting in - 8.70 kcal/mol and - 7.80 kcal/mol, respectively. The docking energy decreases when the flavonoid loses glucose molecules.

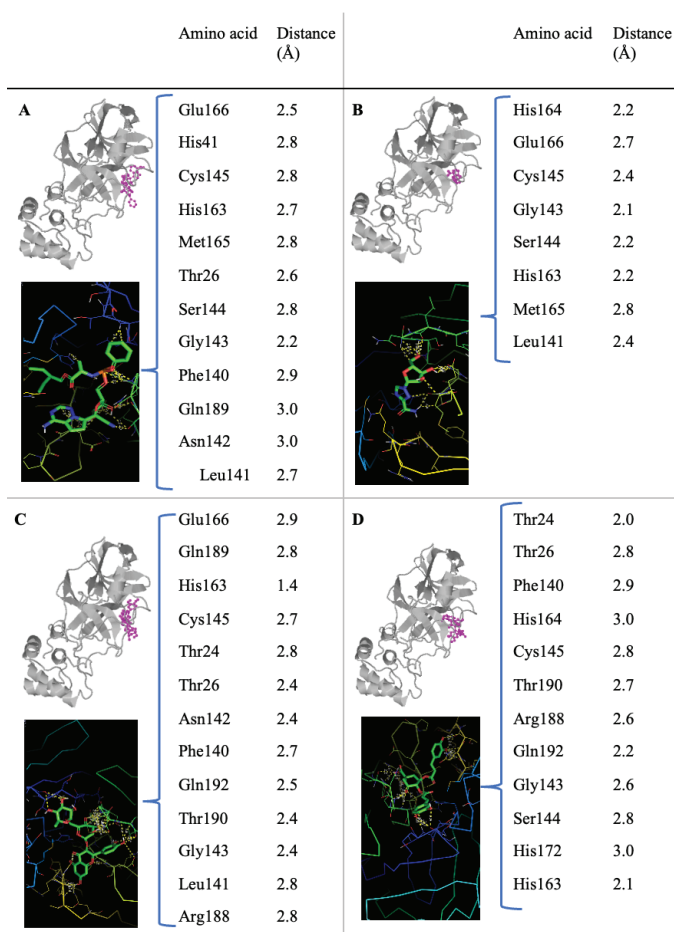
Molecular docking predicted that polyphenols from yerba mate and jarilla have inhibitory potential against SARS-CoV-2 infection by interacting with the Mpro protein. The binding between Mpro and Remdesivir, Ribavirin, the bioactive compounds rutin and 3,4-dicaffeoylquinic acid (which presented the highest docking score) as a potential inhibitor of COVID-19 are shown in Figure 1. They have been represented in distinct colors for better visualization. Figure 1 corroborates the high-affinity potential listed in Table 1. There are two parameters to evaluate a better docking, a docking score and the type of interaction. A better docking score is one with more negative binding energy. The stability between ligands and the receptor is attributed to dispersion forces, hydrogen bonds,  $\pi$ - $\pi$  interactions, and hydrophobic interactions (Mpiana *et al.*, 2020). Yu *et al.* (2020) ETCM database and document mining methods were used to collect active compounds. Swiss TargetPrediction and SuperPred server were used to find targets of compounds with smiles number. Drugbank and Genecard database were used to collect antiviral drug targets. Then the above targets were compared and analyzed to screen out antiviral targets of Mongolia medicine. Metascape database platform was used to enrich and analyze the GO (Gene ontology, demonstrated

that molecules present in traditional Mongolian medicine, such as chlorogenic acid, combine with SARS-CoV-2 protein in the form of hydrogen bonds.

The results confirmed that rutin and 3,4-dicaffeoylquinic acid interacted with His41 and Cys145, which are catalytic residues of Mpro by hydrogen bonding. Both rutin and 3,4-dicaffeoylquinic acid formed hydrogen bonds with Cys145 amino acid residues of Mpro. The rutin derivatives (quercetin and isoquercetin) form hydrogen bonds with the His41 amino acid residues of Mpro. In addition to these two key residues, several other Mpro active site amino acid residues were involved in hydrogen bonding (Glu166, Thr190, Gln189, Asn142, and Leu141) (Ghosh *et al.*, 2020; Kneller *et al.*, 2020). The distance between the ligands ( $\leq 3 \text{ \AA}$ ) in relation to His41 and Cys145 within Mpro (active site) presents higher interaction. Given the affinity and interaction of the catalytic amino acids, they could inhibit/decrease the catalytic activity of the Mpro protease. These are important candidates for an alternative treatment of SARS-Cov-2, applying them in infusion or purified phenolic compounds. *In silico* experiments predict promising results.

## CONCLUSION

The extracts of yerba mate and jarilla leaves presented a high antioxidant activity *in vitro*. The antioxidant activity is due to the hydroxyl and methoxy groups that form the structure of phenolic compounds and would be important to inhibit cell damage caused by free radicals. According to *in silico* results, the main compounds identified in these extracts showed an inhibitory potential against COVID 19 Mpro protease. However, the compounds of yerba mate, rutin, and 3,4-dicaffeoylquinic acid showed a high affinity and interaction with one of the catalytic residues (Cys145) and rutin



**Fig. 1** 2D representation of the interaction of Mpro COVID-19 with the anti-viral drug (A) Remdesivir, (B) Ribavirin, (C) Rutin, and (D) 3,4-dicaffeoylquinic acid.

**Fig. 1** Representación 2D de la interacción de Mpro COVID-19 con el fármaco antiviral (A) Remdesivir, (B) Ribavirina, (C) Rutina y (D) ácido 3,4-dicaféoilquinico.

derivatives His41 when compared with the antiviral drugs Remdesivir and Ribavirin. The glycosylation of phenolic compounds affects biological activities: positively anti-COVID-19 and negatively antioxidant. These results suggest that yerba mate and jarilla leaves could be used as a potential source of bioactive compounds for potential use in the food and pharmaceutical industries.

## REFERENCES

- Agüero, M.B., Svetaz, L., Sánchez, M., Luna, L., Lima, B., López, M.L., Zacchino, S., Palermo, J., Wunderlin, D., Feresin, G.E., and Tapia, A. 2011. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 1970-1978.
- Aguirre-Joya, J.A., Pastrana-Castro, L., Nieto-Oropeza, D., Ventura-Sobrevilla, J., Rojas-Molina, R., and Aguilar, C.N. 2018. The physicochemical, antifungal and antioxidant properties of a mixed polyphenol based bioactive film. *Heliyon*. 4: e00942.

- Benzie, I., and Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.
- Cárdenas-Hernández, E., Torres-León, C., Ascacio-valdés, J.A., Contreras-Esquivel, J.C., and Aguilar, C.N. 2020. Influence of drying and extraction technology on the chemical profile and antioxidant property of mexican mango byproduct. In: Badwaik, S., Aguilar, Cristobal N., Haghi, A.K. (Eds.), *Food Loss and Waste Reduction: Technical Solutions and Control*. Apple Academic Press.
- Chen, J., Wang, Y., Gao, Y., Hu, L.S., Yang, J., Wang, J., Sun, W., Liang, Z., Cao, Y., and Cao, Y. 2020. Protection against COVID-19 injury by qingfei paidu decoction via anti-viral, anti-inflammatory activity and metabolic programming. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 129: 110281.
- Colpo, A.C., Rosa, H., Lima, M.E., Pazzini, C.E.F., De Camargo, V.B., Bassante, F.E.M., Puntel, R., Ávila, D.S., Mendez, A., and Folmer, V. 2016. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chemistry* 209: 185-195.
- Das, S., Sarmah, S., Lyndem, S., and Singha Roy, A. 2020. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 0: 1-11.
- Ghosh, R., Chakraborty, A., Biswas, A., and Chowdhuri, S. 2020. Evaluation of green tea polyphenols as novel corona virus (SARS CoV-2) main protease (Mpro) inhibitors—an in silico docking and molecular dynamics simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 0: 1-13.
- Gimeno, A., Mestres-Truyol, J., Ojeda-Montes, M.J., Macip, G., Saldivar-Espinoza, B., Cereto-Massagué, A., Pujadas, G., and Garcia-Vallvé, S. 2020. Prediction of novel inhibitors of the main protease (M-pro) of SARS-CoV-2 through consensus docking and drug reposition. *International Journal of Molecular Sciences*. 21: 3793
- Hung, I.F., Lung, K., Tso, E.Y., Liu, R., Chung, T.W., Chu, M., Ng, Y., Lo, J., Chan, J., Tam, A.R., Shum, H., Chan, V., Wu, A.K., Sin, K., Leung, W., Law, W., Lung, D.C., Sin, S., Yeung, P., Yip, C.C., Zhang, R.R., Fung, A.Y., Yan, E.Y., Leung, K., Ip, J.D., Chu, A.W., Chan, Wan-mui, Ng, A.C., Lee, R., Fung, K., Yeung, A., Wu, T., Chan, J.W., Yan, W., Chan, Wai-ming, Chan, J.F., Lie, A.K., and Tsang, O.T. 2020. Triple combination of interferon beta-1b , lopinavir – ritonavir , and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19 : an open-label , randomised , phase 2 trial. *The Lancet*. 6736: 1-10.
- Jacques, R.A., dos Santos Freitas, L., Pérez, V.F., Dariva, C., de Oliveira, A.P., de Oliveira, J.V., and Caramão, E.B. 2007. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14: 6-12.
- Kneller, D.W., Phillips, G., O'Neill, H.M., Jedrzejczak, R., Stols, L., Langan, P., Joachimiak, A., Coates, L., and Kovalevsky, A. 2020. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. *Nature Communications*. 11: 7-12.
- Kong, R., Yang, G., Xue, R., Liu, M., Wang, F., Hu, J., Guo, X., and Chang, S., 2020a. COVID-19 Docking Server: a meta server

- for docking small molecules, peptides and antibodies against potential targets of COVID-19. *Bioinformatics*. 36: 5109-5111.
- Kong, R., Yang, G., Xue, R., Liu, M., Wang, F., Hu, J., Guo, X., and Chang, S., 2020b. COVID-19 Docking Server: An interactive server for docking small molecules, peptides and antibodies against potential targets of COVID-19 [WWW Document]. arXiv Prepr. URL <http://arxiv.org/abs/2003.00163>
- Kulkarni, S.A., Nagarajan, S.K., Ramesh, V., Palaniyandi, V., Selvam, S.P., and Madhavan, T. 2020. Computational evaluation of major components from plant essential oils as potent inhibitors of SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of Molecular Structure*. 1221: 128823.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26: 211-219.
- Mpiana, P.T., Ngbolua, K. te N., Tshibangu, D.S.T., Kilembe, J.T., Gbolo, B.Z., Mwanangombo, D.T., Inkoto, C.L., Lengbiye, E.M., Mbadiko, C.M., Matondo, A., Bongo, G.N., and Tshilanda, D.D. 2020. Identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease from *Aloe vera* compounds: A molecular docking study. *Chemical Physics Letters*. 754: 137751.
- Newman, D.J., and Cragg, G.M. 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 83: 770-803.
- Olszowy, M. 2019. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. *Plant Physiology and Biochemistry*. 144: 135-143.
- Perestrelo, R., Lu, Y., Santos, S.A.O., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Câmara, J.S., and Rocha, S.M. 2012. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC – DAD – ESI-MS n Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chemistry*. 135: 94-104.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.
- Schinella, G.R., Troiani, G., Dávila, V., de Buschiazzi, P.M., and Tournier, H.A. 2000. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 269: 357-360.
- Singh, A.K., Singh, A., Singh, R., and Misra, A., 2020. Remdesivir in COVID-19: A critical review of pharmacology, pre-clinical and clinical studies. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 14: 641-648.
- Torres-León, C., Aguirre-Joya, J., Czaja, A., and Aguillón-Gutiérrez, D. 2020. In silico Screening bioaktiver Verbindungen aus mexikanischen Wüstenpflanzen zur Vorhersage potenzieller Inhibitoren von SARS- Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Journal of Medicinal & Spice Plants*. 2: 153-156.
- Torres-León, C., Rojas, R., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R., and Aguilar, C.N. 2017a. Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization assisted by microwave. *Food and Bioproducts Processing*. 105: 188-196.
- Torres-León, C., Ventura-Sobrevilla, J., Serna-Cock, L., Ascacio-Valdés, J.A., Contreras-Esquivel, J., and Aguilar, C.N. 2017b. Pentagalloylglucose (PGG): A valuable phenolic compound with functional properties. *Journal of Functional Foods*. 37: 176-189.
- Vargas-Arispuro, I., Reyes-Báez, R., Rivera-Castañeda, G., Martínez-Téllez, M.A., and Rivero-Espejel, I. 2005. Antifungal lignans from the creosotebush (*Larrea tridentata*). *Industrial Crops and Products*. 22: 101-107.
- Yu, J. Wang, Wang, L., and Bao, L. 2020. Exploring the active compounds of traditional Mongolian medicine in intervention of novel coronavirus (COVID-19) based on molecular docking method. *Journal of Functional Foods*. 71: 104016.
- Zapata, F.J., Rebollo-Hernanz, M., Novakofski, J.E., Nakamura, M.T., and Gonzalez de Mejia, E. 2019. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation. *Journal of Functional Foods*. 64: 103646.



# Evaluación de consorcios micorrícicos arbusculares nativos en interacción con niveles de fósforo en la promoción del crecimiento y fotosíntesis de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Evaluation of native arbuscular mycorrhizal consortia in interaction with phosphorus levels in the promotion of growth and photosynthesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni

R. Cauch-Cauch<sup>1</sup>, J.M. Tun-Suárez<sup>1</sup>, J. Cristóbal-Alejo<sup>1</sup>, E. Herrera-Parra<sup>2</sup>, R. Andueza-Noh<sup>1</sup> and M.G. Lozano-Contreras<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México, Conkal, Yucatán, México.

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Mochochá, Yucatán, México.

## RESUMEN

La creciente demanda de *Stevia rebaudiana* Bertoni como edulcorante natural, exige la búsqueda de sistemas de producción más sostenibles. El fósforo es indispensable en este cultivo, al estar involucrado en procesos de transformación de energía y biosíntesis de fitoquímicos; su poca disponibilidad afecta la producción y retarda el crecimiento de las plantas. La simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) representa una vía sostenible para aumentar la producción de los cultivos, gracias a una mejor absorción de nutrientes, particularmente fósforo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de consorcios de HMA nativos, provenientes de las localidades: Reserva Cuxtal (RC), Tizimín (TZ) y Colonia Yucatán (CY) pertenecientes al estado de Yucatán, en interacción con porcentajes de fósforo en base a su requerimiento nutricional, sobre parámetros de crecimiento y fotosíntesis en *S. rebaudiana* a nivel invernadero. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial 4 X 5. Los resultados indicaron que, a bajas concentraciones de fósforo, hay mayor colonización micorrícica. Los tratamientos RC+25 % P y CY+25 % P aumentaron el crecimiento, mejoraron la arquitectura aérea de las plantas y la producción de biomasa, derivado de un mayor contenido de clorofila y mejor tasa fotosintética con respecto a plantas no inoculadas.

**Palabras clave:** hierba dulce; edulcorante natural; asociación; colonización; fosfato.

## ABSTRACT

The growing demand for *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural sweetener requires the search for more sustainable production systems. Phosphorus is essential in this crop, as it is involved in processes of energy transformation and biosynthesis of phytochemicals; its low availability affects production and retards plant growth. Symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) represents a sustainable way to increase crop production, thanks to a better absorption of nutrients, particularly phosphorus. The objective of this study was to evaluate the effect of native AMF consortia, from the locations: Reserva Cuxtal (RC), Tizimín (TZ) and Colonia Yucatán (CY) belonging to the state of Yucatán, with percentages of phosphorus based on its nutritional requirement, on growth parameters and photosynthesis in *S. rebaudiana*

at the greenhouse level. A completely randomized design with a 4X5 bifactorial arrangement was used. The results indicated that, at low concentrations of phosphorus, there is greater mycorrhizal colonization. The RC+25 % P and CY+25 % P treatments increased growth, improved the aerial architecture of the plants and biomass production, derived from a higher chlorophyll content and a better photosynthetic rate compared to non-inoculated plants.

**Keywords:** sweet grass; natural sweetener; association; colonization; phosphate.

## INTRODUCCIÓN

La creciente demanda por edulcorantes naturales sin calorías sitúa la planta de *S. rebaudiana* como cultivo potencial en el mercado alimentario y farmacéutico (Ahmad *et al.*, 2020). Las hojas de *S. rebaudiana* son una parte importante en la planta, presentan una composición única de glucósidos que son biológica y económicamente importantes, su poder edulcorante es mayor a la sacarosa (Tavarini *et al.*, 2015). El rendimiento del cultivo depende en gran medida del crecimiento de las plantas y su producción de hojas (Mandal *et al.*, 2013; Uçar *et al.*, 2018), que, a su vez depende de la eficiencia en la absorción de nutrientes con baja disponibilidad y movilidad en el suelo (Vafadar *et al.*, 2014). El fósforo es un nutriente esencial en la nutrición de la planta (Abdel-Fattah *et al.*, 2014), interviene en procesos de transporte, almacenamiento y transformación de energía, en la fotosíntesis, respiración, división y elongación celular (Dissanayaka *et al.*, 2021). Además, estimula la formación de órganos en las plantas, el crecimiento radicular y la formación de brotes. Sin embargo, en la mayoría de los suelos agrícolas, su disponibilidad es limitada y la producción de los cultivos se ve seriamente restringida (Richardson, 2001).

En las plantas, existen dos formas de absorción de fósforo; una es por medio de los propios transportadores de la planta y la otra ocurre a través de la simbiosis de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Sarmiento-López *et al.*, 2020). La simbiosis entre HMA y las plantas es una asociación de tipo mutualista, ya que ambos simbiosomas se benefician (Waller *et al.*, 2018). Los HMA obtienen fotosintatos de la planta, a cambio, forman un sistema ramificado de hifas

\*Autor para correspondencia: Mónica Guadalupe Lozano Contreras  
 Correo electrónico: lozano.monica@inifap.gob.mx

Recibido: 21 de junio de 2022

Aceptado: 18 de septiembre de 2022

extraradicales capaces de explorar el suelo más allá de la zona de influencia de las raíces, esta condición en el suelo favorece la traslocación de agua y nutrientes para la planta (particularmente de fósforo) y mejora la tasa fotosintética, al regular la conductancia estomática, lo que promueve la producción de los cultivos (Nouri *et al.*, 2014; Adolfsson *et al.*, 2015; Tekaya *et al.*, 2017; Kothe y Turnau, 2018). Los HMA representan una herramienta útil en la agricultura moderna, ya que puede reducir los insumos químicos, así como el impacto en el medio ambiente (Giovannini *et al.*, 2020). En los últimos años, los HMA se han utilizado para promover el aumento de la producción en cultivos de importancia económica (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2014; Alvarado Carrillo *et al.*, 2014; Díaz Franco *et al.*, 2015). También se han reportado aumentos en la productividad de *S. rebaudiana* por efecto de la simbiosis micorrícica. Por ejemplo; Tedone *et al.* (2020) reportaron que la inoculación de HMA en *S. rebaudiana* influyó significativamente en la producción de biomasa seca aérea. Asimismo, Aguirre-Medina *et al.* (2020) observaron un aumento en el área foliar y en el número de hojas de *S. rebaudiana* a los 90 días después de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*. Los beneficios sinérgicos de la inoculación de HMA en *S. rebaudiana* también han mejorado significativamente el crecimiento de brotes y longitud de raíz (Vafadar *et al.*, 2014). Por su parte, Sarmiento-López *et al.* (2020) observaron un aumento en el peso fresco de hojas y raíces en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *R. irregularis* y fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fósforo. Adicionalmente, Mandal *et al.* (2013) describen que la mejora en los aumentos en la producción de los cultivos, involucra mecanismos tanto nutricionales como no nutricionales, estos resultados sugieren la importancia del papel del fósforo en la simbiosis de HMA y *S. rebaudiana*, ya que el fósforo puede inhibir la colonización micorrícica (Tavarini *et al.*, 2018). En este contexto, se desconoce el nivel de fósforo óptimo que permita el desarrollo de la simbiosis de los HMA nativos de suelos de Yucatán con *S. rebaudiana*. Por otro lado, la mayoría de las especies de HMA utilizados en los sistemas agrícolas corresponden a cepas no nativas, la mayoría de los productos comerciales se centran en una sola especie, lo que limita su efectividad por el hecho de competir con la microbiota local (Kouadio *et al.*, 2017; Giovannini *et al.*, 2020). Se sabe que, la eficiencia de los HMA en las plantas, depende de la riqueza y composición de las especies inoculadas, sin embargo, diferentes cepas de HMA, incluso nativas, pueden tener un efecto diferencial en distintas especies de plantas (Trejo *et al.*, 2011; Vosátka *et al.*, 2012). Por lo tanto, el uso de consorcios nativos de HMA ha demostrado una mayor eficiencia en términos de aumentar el crecimiento y la productividad de las plantas hospederas (Douds *et al.*, 2012; Eun-Hwa *et al.*, 2013; Reyes-Ramírez *et al.*, 2014). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de consorcios nativos de HMA en interacción con niveles de fósforo en la promoción del crecimiento y tasa fotosintética de *S. rebaudiana* en condiciones de invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio experimental

La investigación se realizó dentro de una estructura protegida en el área de investigación del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, ubicado en Av. Tecnológico s/n Conkal, Yucatán, al noreste de Mérida a 21° 04' N y 89° 31' O, a una altitud de 8 m, el clima predominante es Awo (x') (i') g (Márdero *et al.*, 2012).

### Consortios de HMA

Se evaluaron tres consorcios nativos de HMA, que fueron nombrados según su lugar de origen, los cuales provenían de localidades diferentes del estado de Yucatán, en suelos donde predominan comunidades vegetales de selva baja caducifolia tropical y suelo de tipo Leptosol (Durán García y García Contreras, 2010). Los consorcios se determinaron como: 1) Reserva Cuxtal (RC); (integrado por *Glomus ambisporum* G.S.Sm. y N.C. Schenck, *G. pustulatum* Koske, Friesse, C. Walker y Dalp, *Claroideoglomus claroideum* C. Walker y A. Schussler, *Funneliformis geosporum* y *Ambispora gerdemanni* C. Walker) identificado a nivel morfológico por Herrera-Parra *et al.* (2021); 2) Tizimín (TZ) (sin identificar) y 3) Colonia Yucatán (CY) (sin identificar). Además, se incluyó un tratamiento testigo sin inocular.

### Propagación y extracción de HMA

Los consorcios de HMA se propagaron por la técnica de cultivo trampa (Sieverding, 1990), se utilizaron macetas de 10 kg de capacidad con suelo tamizado y mezclado con arena estéril (1:1 v/v) donde se sembraron semillas de sorgo cv. Criollo (*Sorghum bicolor* L.) y maíz (*Zea mays* L.) como macetas de propagación (Herrera-Parra *et al.*, 2021). El cultivo trampa se monitoreó y mantuvo en un vivero a una temperatura de 22 - 38 °C y h: 42 % en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-C.E. Mochochá. Después de 55 días, las plantas trampa se retiraron de la maceta de propagación y se removió el sustrato con las raíces colonizadas, posteriormente, se sembraron nuevas semillas y reinició el ciclo. Se realizaron riegos a capacidad de campo, después de 80 d se suspendió el riego con el fin de estimular la esporulación de los HMA. Después de 112 d se tomó una muestra de 100 g de cada maceta de propagación y se extrajeron los HMA siguiendo el método de tamizado y decantación en húmedo por centrifugación (Gerdemann y Nicolson, 1963). El suelo se homogenizó en agua y se agitó, la solución se filtró a través de una serie de tamices con apertura de mallas de 600, 425, 90 y 25  $\mu\text{m}$ , y de las fracciones retenidas se extrajeron las esporas de los HMA mediante filtración a vacío.

### Obtención del inóculo

Para la obtención del inóculo, se desinfectaron las esporas adicionando Tween 20 a 0.05 %, se centrifugaron a 500 rpm por 1 minuto, después se eliminó el sobrenadante y se adicionó Cloramina T al 2 %, se centrifugó a 500 rpm durante 15 min, estos dos procedimientos se repitieron en

dos ocasiones, finalmente, se retiró el sobrenadante (Bécard y Piché, 1992). Cada consorcio contenía 110 esporas mL<sup>-1</sup> con un promedio de cuatro morfoespecies presentes. Los inóculos se mantuvieron a 4 °C hasta su aplicación.

### Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni variedad Morita II, propagadas por esqueje, a partir de plantas cultivadas con seis meses de edad. El material vegetal fue proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), C.E. Mochochá.

### Establecimiento del experimento

El trasplante se realizó el 9 de marzo de 2021, cuando las plántulas alcanzaron una altura de 15 cm en promedio. Se utilizaron bolsas de vivero con capacidad de 7 L. Las bolsas se distribuyeron dentro de un invernadero a una distancia de 0.30 y 1.0 m entre plantas e hileras, respectivamente. Se aplicó riego por goteo con el 80 % de la evapotranspiración de referencia, calculado en mm día<sup>-1</sup>, para ello se utilizaron los registros diarios de la evaporación de un tanque evaporímetro tipo A, instalado dentro del área experimental (Cauich-Cauich *et al.*, 2018). Las temperaturas promedio registradas, en la temporada de crecimiento fueron de 38.8 °C como máxima y 22.5 °C como mínima, mientras que la humedad relativa osciló entre 26 - 91 %.

### Propiedades fisicoquímicas del sustrato

El análisis fisicoquímico del sustrato (Tabla 1), se realizó en el laboratorio de análisis de suelos, plantas y agua (LASPA) de la Universidad Autónoma de Yucatán. La muestra correspondió a 1 kg del sustrato compuesto de una mezcla de suelo y bagazo viejo de henequén (2:1 v/v). Se realizaron los siguientes métodos: Textura (Hidrómetro de Bouyucos), pH (Potenciómetro), Conductividad Eléctrica (Conductómetro), Nitrógeno total (Micro-Kjeldahl), Fósforo disponible (Olsen; extracción con bicarbonato de sodio), Potasio intercambiable (Extraído con acetato de amonio, por el método de cobaltonitrato), Materia orgánica (Walkley-Black). El sustrato se esterilizó por flujo de vapor a 126 °C durante 7 h utilizando una caldera generadora de vapor (Sioux corporation, Beresford, USA).

### Manejo del cultivo

Se realizaron dos podas de formación al cultivo, la primera se realizó a los 10 días después del trasplante (ddt) con la finalidad de eliminar la dominancia apical e inducir brotes y la segunda se realizó a los 20 ddt para eliminar la floración

del cultivo, la cual no es recomendable por que disminuye el tamaño de la hoja. La cosecha de hojas se llevó a cabo a los 120 ddt al final de la evaluación (Cauich-Cauich *et al.*, 2018). A partir de 30 ddt se suministró fertilización nitrogenada y potásica vía Drench (con 4.09 g N como nitrato de amonio y 4.50 g K como nitrato de potasio por planta respectivamente), se realizaron aplicaciones foliares a punto de rocío de productos orgánicos: Fungicida BioEquus; 3 mL L<sup>-1</sup> e insecticida Neem Higer; 5 mL L<sup>-1</sup> para el control preventivo de plagas y enfermedades.

### Diseño experimental

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial (4X3) para evaluar el efecto de la interacción entre consorcios nativos de HMA y niveles de fósforo. El factor A correspondió a; consorcios nativos de HMA (RC, TZ, CY más un testigo sin inocular (T)) y como factor B; cinco niveles de fósforo (0, 25, 50, 75 y 100 %) suministrado al inicio de la prueba como; 0, 79, 158, 237 y 316 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo respectivamente, en función de su exigencia nutricional (19 kg ha<sup>-1</sup> ciclo) (Ramírez-Jaramillo y Lozano-contreras, 2017). Los consorcios de HMA se aplicaron directamente en la zona radicular con 110 esporas al momento del trasplante. La interacción de los factores totalizó 20 tratamientos, con 4 repeticiones y 80 unidades experimentales.

### Determinación de la colonización micorrícica

A los 120 ddt se estimó el porcentaje de colonización por HMA, las raíces se lavaron con agua de la llave, se transportaron al laboratorio y se tiñeron con azul de tripano 0.05 %, siguiendo la técnica de Phillips y Hayman (1970). Con las raíces teñidas se realizaron preparaciones permanentes para observar las estructuras de HMA que indicaban colonización (micelio, esporas, vesículas, arbusculos y enrollamientos). La colonización micorrícica total se calculó según el método de intersección de líneas (Giovannetti y Mosse, 1980). Para cada tratamiento, se evaluaron 100 segmentos de raíces de cinco plantas.

### Parámetros del crecimiento vegetativo

Al final del experimento (120 ddt) se evaluó el crecimiento de la planta mediante las variables; altura final de la planta (cm), medida con un flexómetro desde la base del tallo hasta el último ápice foliar, diámetro del tallo (mm), medido con un vernier digital colocado a 3 cm de la superficie del suelo, número de ramas (n planta<sup>-1</sup>), longitud de la raíz (cm) con un flexómetro, volumen de raíz (cm<sup>3</sup>) con base en el

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas del sustrato utilizado en el experimento.

**Table 1.** Physico-chemical characteristics of the substrate used in the experiment.

Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase textural	Materia orgánica (%)	pH	C.E. (dS m <sup>-1</sup> )	CIC (meq/100g)	N Total (%)	P Disponible (mg kg <sup>-1</sup> )	K Intercambiable (meq/100g)
57.32	14	28.68	Franco arcillo-arenoso	9.58	6.3	0.007	121.23	0.83	74.335	0.19

C.E: Conductividad eléctrica, CIC: Capacidad de intercambio catiónico, N: Nitrógeno, P: Fósforo, K: Potasio

principio de Arquímedes, usando una balanza de precisión y un vaso de precipitados con agua, al sumergir las raíces en el agua, sin tocar las paredes del vaso, se registra un aumento de peso en el sistema (medido en g) que equivale al volumen de la raíz en cm<sup>3</sup>, y área foliar (cm<sup>2</sup>), con un integrador electrónico de área modelo LICOR LI300 (LI-COR, Inc. Lincoln, NE). Adicionalmente se calculó el índice morfológico; relación raíz a brote (materia seca de raíz / materia seca aérea (tallos y hojas) como indicador de la calidad de la planta (Arizaleta y Pire, 2008).

Se determinó la producción y distribución de biomasa seca (g planta<sup>-1</sup>), para ello se separaron los órganos de la planta (raíz, tallo y hojas), los cuales se depositaron en bolsas de papel y se secaron en una estufa de aire forzado a 70 °C por 72 h hasta peso constante, posteriormente se pesaron en una balanza analítica.

**Determinación de parámetros fisiológicos**

El valor relativo de clorofila como índice SPAD, se midió con un medidor de clorofila portátil SPAD-502 plus Minolta según la metodología de Markwell *et al.* (1995). El intercambio de gases; tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> (fotosíntesis), conductancia estomática, transpiración y uso eficiente del agua a escala foliar, se midieron con un analizador de gases en infrarrojo (LICOR LI-6400, Nebraska, Estados Unidos). Las mediciones de clorofila e intercambio de gases, se realizaron a los 120 ddt en cuatro hojas jóvenes totalmente expandidas ubicadas en el estrato alto de tres plantas por tratamiento, entre las 12:00 y 13:00 horas cuando ocurría la mayor densidad de flujo de fotones (1000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) (Garraña-Hernández *et al.*, 2014).

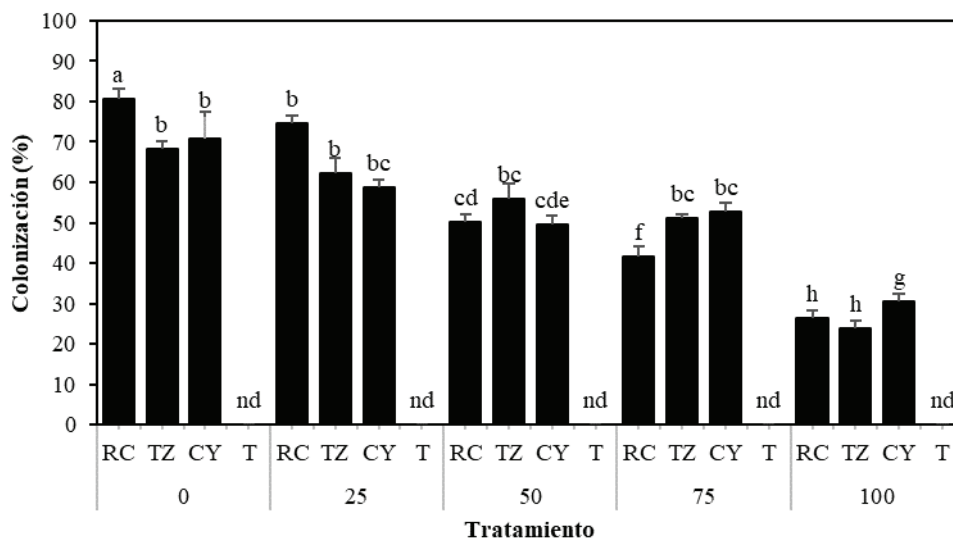
**Análisis estadístico**

Con los datos obtenidos de las variables, se realizaron análisis de varianza y para el caso de los datos relacionados con la colonización de los HMA (porcentaje de colonización total) que no cumplieron con los supuestos de distribución normal, fueron transformados para homogenizar varianzas mediante la función de arco seno;  $y = \arcsin(\sqrt{\text{colonización}})$ . Se aplicó como comparador de medias el método de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) mediante el paquete estadístico InfoStat versión 2014 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Colonización micorrícica total en *S. rebaudiana***

Los consorcios nativos de HMA utilizados en el estudio, colonizaron las raíces de *S. rebaudiana* a los 120 ddt. La fertilización con fósforo afectó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) la colonización de los consorcios micorrícicos RC, TZ y CY. El porcentaje de colonización total mostró un comportamiento inversamente proporcional a la concentración de fósforo, es decir, mientras mayor fue la concentración de fosforo aplicado, menor fue el porcentaje de colonización. La interacción entre RC+0 y RC+79 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, fue superior en el porcentaje de colonización total observada de los consorcios de HMA en *S. rebaudiana* (80.6 y 74.6% respectivamente), sin embargo, RC+79 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo no se diferenció estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) de TZ y CY con la misma concentración de fósforo (62.2 y 58.8 % respectivamente) (Figura 1). Por el contrario, el porcentaje de colonización total disminuyó en los consorcios CY, RC y TZ cuando se fertilizó con 316 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, registrando 30.4, 26.4 y 23.8 % respectivamente, sin embargo, esta disminución no obstaculizó el



**Figura 1.** Porcentaje de la colonización micorrícica total en raíces de *S. rebaudiana* con consorcios nativos de HMA y niveles de fósforo a los 120 ddt. nd: no detectado. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , prueba de Tukey),  $n = 5$ .

**Figure 1.** Percentage of total mycorrhizal colonization in roots of *S. rebaudiana* with native AMF consortia and phosphorus levels at 120 dat. nd: not detected. Distinct letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ , Tukey Test),  $n = 5$ .



efecto que los HMA pudieron tener sobre otras variables. Por otro lado, no se detectó colonización en plantas testigo. Se observaron hifas extra e intraradicales, vesículas y esporas y arbusculos bajo microscopio compuesto a 10, 40 y 100 X en muestras representativas de cada consorcio con 79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo (Figura 2). Al respecto, la disponibilidad del fósforo puede influir en la simbiosis HMA-planta y, en consecuencia, en la biomasa de la raíz (Balzergue *et al.*, 2013). Smith *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares, al observar una reducción significativa en el porcentaje de colonización, asociada con aumentos en las dosis de fósforo en el suelo. También son congruentes con los resultados de Mandal *et al.* (2013), quienes obtuvieron 87 % de colonización total en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *Rhizophagus fasciculatus*, y una reducción al 74 % cuando se aplicó 50 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo. Por su parte, Tavarini *et al.* (2018) confirmaron que *S. rebaudiana* es susceptible a la colonización por HMA observando un porcentaje de colonización del 87.6 %; sin embargo, adicionando 50 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, obtuvieron 75.8 % de raíces colonizadas. Al respecto, se ha reportado que, la presencia de estrigolactonas (hormonas vegetales involucradas en la etapa presimbiótica) se correlaciona negativamente con la concentración de fósforo. Es decir, aumentan en condiciones deficientes de fósforo, favoreciendo la colonización micorrícica (López-Ráez *et al.*, 2011; López-

Ráez y Pozo, 2013). En contexto con los hallazgos previos, los consorcios nativos de HMA evaluados en este estudio (RC, TZ y CY), mostraron potencial para colonizar de 65 a 74.8 % las raíces de *S. rebaudiana* actuando en sinergia con 79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo.

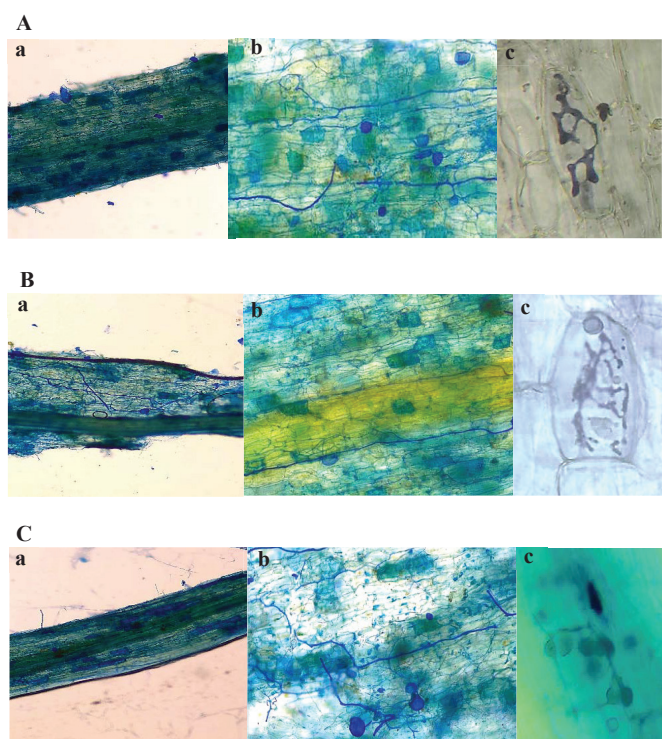
### Efecto en el crecimiento vegetativo de *S. rebaudiana*

La respuesta de las plantas de *S. rebaudiana* en el crecimiento vegetativo, se determinó a los 120 ddt. El efecto principal de los consorcios de HMA, presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en las variables: número de ramas, área foliar, volumen de raíz y en la relación raíz/brote. El efecto de los niveles de fósforo presentó significancia ( $P \leq 0.05$ ) en las variables: área foliar y volumen de raíz, mientras que, la interacción entre los consorcios de HMA y los niveles de fósforo tuvo efectos significativos ( $P \leq 0.05$ ) en la altura final, diámetro del tallo y longitud de raíz.

Las plantas más altas se registraron en los tratamientos CY, TZ y RC en interacción con 158 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, alcanzando una altura final de 31.6, 31.5 y 31.2 cm respectivamente, teniendo un efecto estadísticamente igual ( $P \leq 0.05$ ) entre sí, junto con RC y TZ con 79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo (29.8 y 30.3 respectivamente), pero diferente con el tratamiento T+316 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo (26.8 cm) que representa la fertilización convencional (Tabla 2). Las plantas inoculadas con consorcios nativos de HMA mejoraron la altura incluso sin fertilización con fósforo en comparación con plantas testigo, probablemente a que tuvieron un mayor porcentaje de colonización. Este resultado pone en evidencia la diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) del uso de HMA junto a niveles de fósforo menores a la fertilización convencional, sobre la mejora en altura de las plantas en *S. rebaudiana*.

Diversos estudios destacan la capacidad de los consorcios de HMA para promover el crecimiento de hortalizas de importancia económica como chile serrano y jalapeño (Leos-Escobedo *et al.*, 2022). Por otro lado, Quiñones-Aguilar *et al.* (2014) reportaron un efecto similar en la dinámica de crecimiento de *Carica papaya* L., observando mayor altura con niveles bajos de fósforo junto a la inoculación de *Glomus* spp. Resultados semejantes que involucran fertilización con fósforo fueron los de Alarcón y Ferrera-Cerrato (2003) quienes registraron la mayor altura en plantas de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq., cuando se inocularon con un consorcio micorrícico integrado por tres especies del género *Glomus* y fertilizadas con 20 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo. Los HMA son útiles para promover el crecimiento de las plantas sin la necesidad de utilizar altas dosis de fertilizantes (Vafadar *et al.*, 2014).

El diámetro de la base del tallo en las plantas de *S. rebaudiana* fue mayor en los tratamientos CY y RC junto a 79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, manteniendo un espesor de 3.8 y 3.7 mm respectivamente, estos valores fueron significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) a los obtenidos con T+316 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo (manejo convencional) en un 32 %. En este sentido, el diámetro del tallo, representa un parámetro indispensable en el crecimiento y rendimiento de las plantas, a mayor grosor del tallo, mayor es el área del parénquima vascular, lo que



**Figura 2.** Raíces de *S. rebaudiana* colonizadas con consorcios nativos de HMA. A) raíces colonizadas con B) raíces colonizadas con TZ, y C) raíces colonizadas con CY, hifas extraradicales (a) (10X), vesículas e hifas intraradicales (b) (40X), arbusculo (c) (100X), con 25 % de fertilización con fósforo.

**Figure 2.** *S. rebaudiana* roots colonized with native AMF consortia. A) roots colonized with RC, B) roots colonized with TZ, and C) roots colonized with CY, extraradical hyphae (a) (10X), vesicles and intraradical hyphae (b) (40X), arbuscule (c) (100X), with 25 % phosphorus fertilization.

**Tabla 2.** Efecto de la inoculación de consorcios nativos de HMA y la aplicación de fósforo sobre altura final de la planta, diámetro del tallo, número de ramificaciones y área foliar de *S. rebaudiana* a los 120 ddt.

**Table 2.** Effect of the inoculation of native AMF consortia and the application of phosphorus, on the final height of the plant, stem diameter, number of branches and leaf area of *S. rebaudiana* at 120 dat.

Variable	P (mg de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> kg <sup>-1</sup> suelo)	Consortio de HMA				Media
		RC	TZ	CY	Testigo	
Altura (cm)	0	27.3 ± 2.1 ab	25.3 ± 1.0 b	28.4 ± 1.0 ab	19.9 ± 0.4 cd	25.2 B
	59	29.8 ± 1.9 a	30.3 ± 1.3 a	27.5 ± 2.0 ab	20.8 ± 0.8 c	27.1 AB
	158	30.4 ± 1.1 a	28.0 ± 1.6 ab	28.5 ± 0.8 ab	17.7 ± 0.5 e	26.1 B
	237	31.3 ± 0.7 a	31.5 ± 1.7 a	31.6 ± 0.9 a	22.4 ± 1.1 c	29.2 A
	316	29.8 ± 1.4 a	28.2 ± 1.3 ab	28.0 ± 1.3 ab	26.9 ± 0.9 b	28.2 A
<b>Media</b>		29.7 A	28.7 A	28.8 A	21.6 B	
Significancia: HMAxP= *; HMA= **; P= *						
Diámetro del tallo (mm)	0	2.9 ± 0.2 bc	3.2 ± 0.2 b	3.0 ± 0.1 bc	2.3 ± 0.1 c	2.8 B
	59	3.7 ± 0.2 a	3.2 ± 0.1 b	3.8 ± 0.1 a	2.2 ± 0.1 e	3.2 A
	158	3.3 ± 0.1 b	2.7 ± 0.2 bcd	3.2 ± 0.1 b	2.0 ± 0.1 e	2.8 B
	237	3.1 ± 0.1 bc	3.3 ± 0.2 ab	3.1 ± 0.1 b	2.5 ± 0.1 c	3.0 A
	316	3.4 ± 0.1 ab	3.4 ± 0.1 b	3.1 ± 0.2 b	2.6 ± 0.2 c	3.1 A
<b>Media</b>		3.3 A	3.1 A	3.2 A	2.3 B	
Significancia: HMAxP= *; HMA= **; P= *						
Número de ramificaciones (N° planta <sup>-1</sup> )	0	12.6 ± 2.3	17.0 ± 3.7	11.1 ± 1.3	8.1 ± 0.7	12.2 B
	59	21.9 ± 1.9	20.8 ± 0.8	23.3 ± 3.3	10.0 ± 0.5	19.0 A
	158	16.8 ± 1.6	13.9 ± 1.9	17.9 ± 1.4	6.8 ± 1.1	13.9 B
	237	15.9 ± 1.4	14.8 ± 0.8	18.3 ± 0.9	6.7 ± 1.0	13.9 B
	316	13.8 ± 3.7	14.0 ± 3.9	13.5 ± 3.4	8.6 ± 2.2	12.5 B
<b>Media</b>		16.2 A	16.1 A	16.8 A	8.0 B	
Significancia: HMAxP= ns; HMA= **; P= *						
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	0	608.9 ± 127.9	579.9 ± 168.8	625.0 ± 67.5	401.9 ± 42.4	553.9 B
	59	850.4 ± 42.6	561.3 ± 97.6	745.9 ± 31.1	281 ± 23.5	609.7 B
	158	839.2 ± 105.3	778.8 ± 96.4	891.5 ± 120.6	193.2 ± 30.0	675.7 B
	237	1125.4 ± 104.9	1045.7 ± 152.5	1245.5 ± 101.8	393.9 ± 94.1	952.6 A
	316	1071.6 ± 80.4	1003.4 ± 113.6	1117.6 ± 289.5	738.8 ± 125.4	982.9 A
<b>Media</b>		899.1 A	793.8 A	9.25.1 A	401.8 B	
Significancia: HMAxP= ns; HMA= **; P= *						

Medias (n = 4) ± desviación estándar. Letras minúsculas indican el efecto de la interacción (HMA\*P). Letras mayúsculas en la fila indican el efecto de consorcios (HMA). Letras mayúsculas en la columna indican el efecto de niveles de fósforo (P). La significancia se indica como: ns: no significativo, \*: significativo a P ≤ 0.05, \*\*: significativo a P ≤ 0.01, \*\*\*: significativo a P ≤ 0.001.

Means (n = 4) ± standard deviation. Lower case letters indicate the effect of the interaction (HMA\*P). Capital letters in the row indicate the consortium effect (HMA). Capital letters in the column indicate the effect of phosphorus (P) levels. Significance is indicated as: ns: not significant, \*: significant at P ≤ 0.05, \*\*: significant at P ≤ 0.01, \*\*\*: significant at P ≤ 0.001.

implica mayor reserva de asimilados, así como, mayor área de xilema que posibilita un mayor transporte de agua y nutrientes (Holbrook y Zwieniecki, 2011). Los tratamientos RC y TZ+316 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, junto con TZ+237 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, superaron en efecto al resto de los tratamientos, incluso con niveles más bajos de fósforo (Tabla 2). Asimismo, de manera similar a la variable altura, se observó un aumento significativo en el grosor del tallo de las plantas inoculadas sin fertilización con fósforo, comparadas con plantas testigo con las mismas condiciones. Tanto en la altura final como en el diámetro del tallo, la inoculación de los consorcios nativos RC y TZ con fósforo, generó mejores resultados frente al efecto de la sola inoculación y la sola fertilización con fósforo, es decir, la sinergia de los factores fue indispensable para promover mayor altura y diámetro en *S. rebaudiana*.

En el número de ramificaciones por planta, no se encontró diferencias significativas (P ≤ 0.05) por efecto de

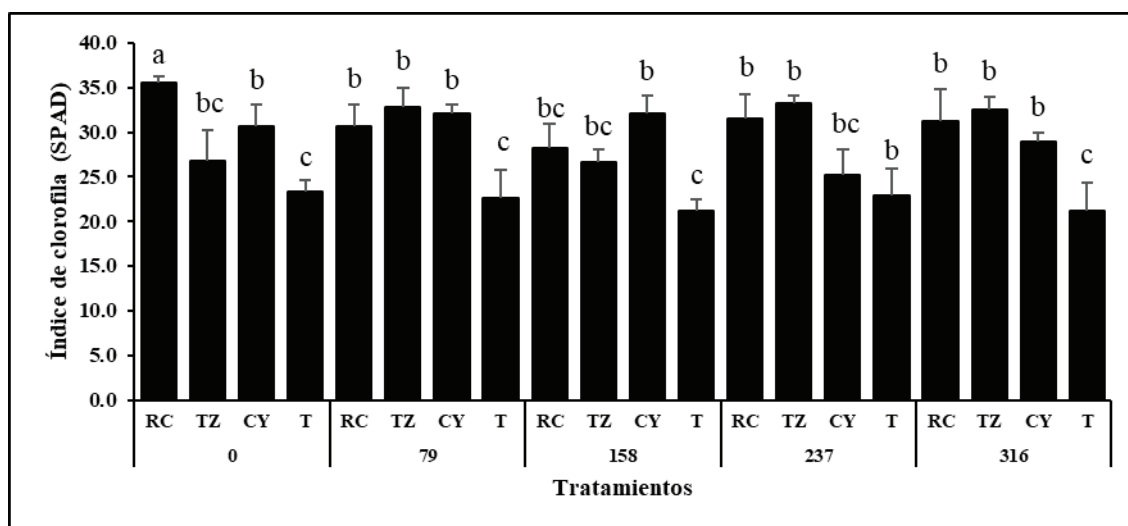
la interacción de los factores (HMA\*P), pero sí por efecto individual tanto de los de los consorcios HMA como de los niveles de fósforo. El efecto de RC, TZ, CY estimulo la formación de 16.9, 16.2 y 16.1 ramificaciones por planta respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas entre ellos, pero contrastando su efecto frente a plantas no inoculadas, las cuales registraron en promedio 8.1 ramificaciones por planta, detectando un aumento aproximado del 50 % en plantas inoculadas. Por parte del efecto del factor fósforo, la fertilización con 79 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, promovió el mayor número de ramificaciones por planta en promedio (19 n planta<sup>-1</sup>) en comparación al resto de los niveles evaluados (Tabla 2). Los efectos beneficiosos de la simbiosis de HMA sobre el aumento de ramas y adecuada formación de la parte aérea de la planta (hojas y tallos) han sido bien reportados en la familia Asteracea de donde pertenece *S. rebaudiana* (Rapparini *et al.*, 2008; Aroca *et al.*, 2013). Según Mandal *et*

*al.* (2015), en *S. rebaudiana*, la simbiosis de HMA induce un cambio en el flujo de metabolitos hacia la biosíntesis de glucósidos de esteviol, en este sentido, la biosíntesis de glucósidos de esteviol y giberelinas (hormonas de crecimiento vegetal) comparten una misma ruta de síntesis (Brandle y Telmer, 2007; Ceunen y Geuns, 2013; Guleria y Yadav, 2013), en relación con eso, las giberelinas están involucradas en la modulación de la ramificación de brotes y el control de la arquitectura aérea de la planta (hojas y tallos) (Rameau *et al.*, 2015) (Ni *et al.*, 2015), lo que podría explicar el aumento del número de ramificaciones observado en las plantas micorrizadas. Por otro lado, aun cuando no se observaron efectos significativos ( $P \leq 0.05$ ) de la interacción HMA\*P, aplicar 25 % de P de la fertilización convencional para la región fue idóneo para mejorar el número de ramificaciones en *S. rebaudiana*. Es bien sabido que la fertilización química podría mejorar el crecimiento de las plantas (altura de las plantas, así como el número de ramas) debido al papel del P como componente esencial de los compuestos de fosfoproteínas y energía (Mostafa, 2019). Sin embargo, lograr esa mejora con dosis menores a las recomendadas, reduce el impacto económico y ambiental de los fertilizantes químicos.

El área foliar a los 120 ddt presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) solo cuando los factores en estudio (HMA y fósforo) se analizaron por separado. A pesar de no encontrarse un efecto significativo de la interacción HMA\*P, el análisis de varianza mostró evidencia del efecto individual de cada factor. Asimismo, los consorcios HMA tuvieron diferencias significativas en comparación con plantas testigo, siendo CY y RC los consorcios que marcaron un incremento de 57 y 44 % el área foliar respectivamente. Por su parte, el consorcio TZ tuvo un efecto estadísticamente igual a los anteriores. Sin embargo, los tres consorcios superaron a plantas testigo sin

inocular, que generó en promedio 401.8 cm<sup>2</sup> (Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados por Aguirre-Medina *et al.* (2020) a los 90 ddt en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con la especie *R. intraradices* y añadidura de estiércol bovino como biofertilizante. En el caso de los niveles del factor fósforo, se observó una tendencia directamente proporcional a la concentración de fósforo suministrado, mientras mayor fue el nivel de fósforo aplicado, el área foliar aumentó (Figura 3). Por lo tanto, este parámetro de crecimiento está directamente relacionado con la capacidad de la planta en la absorción de fósforo (Maniruzzaman *et al.*, 2017). Estos resultados demuestran la influencia de la simbiosis de HMA para expandir la lámina foliar, como se reportó por Sarmiento-López *et al.* (2021), lo que incrementa el área de captación de luz para la fotosíntesis (Tavarini *et al.*, 2015).

El factor de interacción entre consorcios de HMA y niveles de fósforo mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) sobre la longitud de raíz. Los tratamientos CY+158 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo y TZ+237 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, promocionaron la mayor longitud de raíz a los 120 ddt, alcanzando promedios de 12.11 y 11.67 cm respectivamente (Tabla 3). Estos resultados son similares a los reportados por Cauch-Cauch *et al.* (2018) quienes inocularon una sola especie (*R. intraradices*) en plantas de *S. rebaudiana*, por tanto, la inculación de un consorcio micorrícico no causó mayor efecto en la promoción del alargamiento radicular. En cambio, la interacción HMA\*P no fue significativa ( $P \leq 0.05$ ) sobre el volumen de raíz, sin embargo, los consorcios de HMA y niveles de fosforo por separado, mostraron diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ). El volumen radicular de las plantas no inoculadas fue en promedio 0.56 cm<sup>3</sup>, mientras que en las plantas inoculadas con RC, TZ y CY, el volumen de raíz aumentó más del 50 %. Una adecuada arquitectura del sistema radicular en las plantas inoculadas



**Figura 3.** Índice relativo del contenido de clorofila en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con consorcios de HMA (RC, TZ, CY y T) y fertilizadas con niveles de fósforo (0, 79, 158, 237 y 316 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo) a los 120 ddt. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , prueba de Tukey),  $n = 4$ .

**Figure 3.** Relative index of chlorophyll content in *S. rebaudiana* plants inoculated with AMF consortia (RC, TZ, CY and T) and fertilized with phosphorus levels (0, 79, 158, 237 and 316 mg of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> soil) at 120 dat. Different letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ , Tukey's test),  $n = 4$ .

**Tabla 3.** Efecto de la inoculación de consorcios nativos de HMA y la aplicación de fósforo, sobre el crecimiento radicular de *S. rebaudiana* a los 120 ddt.  
**Table 3.** Effect of the inoculation of native AMF consortia and the application of phosphorus, on the root growth of *S. rebaudiana* at 120 dat.

Variable	P (mg de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> kg <sup>-1</sup> suelo)	Consortio de HMA				
		RC	TZ	CY	Testigo	Media
Longitud de raíz (cm)	0	9.78 ± 0.97 b	9.48 ± 0.70 bc	9.13 ± 0.11 bc	7.29 ± 0.77 d	8.92 BC
	79	9.90 ± 0.63 b	10.53 ± 0.84 ab	10.63 ± 0.26 b	6.91 ± 0.62 d	9.49 B
	158	10.97 ± 0.35 ab	10.21 ± 0.82 b	12.11 ± 0.32 a	6.87 ± 1.02 d	10.04 B
	237	10.87 ± 0.52 ab	11.67 ± 0.43 a	9.27 ± 0.57 bc	6.91 ± 0.88 d	9.68 B
	316	11.26 ± 0.19 ab	10.46 ± 0.20 b	10.79 ± 0.56 ab	10.97 ± 0.42 ab	10.87 A
Media		10.56 A	10.47 A	10.39 A	7.79 B	
Significancia: HMAxP= *, HMA= ***, P= *						
Volumen de raíz (cm <sup>3</sup> )	0	0.73 ± 0.28	0.94 ± 0.23	0.84 ± 0.05	0.23 ± 0.02	0.69 C
	79	1.87 ± 0.14	1.76 ± 0.13	1.39 ± 0.41	0.92 ± 0.14	1.48 A
	158	1.33 ± 0.12	1.02 ± 0.10	1.24 ± 0.07	0.65 ± 0.08	1.06 B
	237	1.31 ± 0.13	1.10 ± 0.12	1.09 ± 0.12	0.47 ± 0.10	1.01 B
	316	1.20 ± 0.11	1.31 ± 0.22	1.13 ± 0.15	0.56 ± 0.14	1.05 B
Media		1.29 A	1.23 A	1.14 A	0.56 B	
Significancia: HMAxP= ns; HMA= ***, P= **						
Relación raíz/brote (g planta <sup>-1</sup> )	0	0.10 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.03	
	79	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.21 ± 0.05	
	158	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.20 ± 0.07	
	237	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.01	
	316	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.00	0.19 ± 0.01	
Media		0.12 B	0.12 B	0.09 C	0.15 A	
Significancia: HMAxP= ns; HMA= *, P= ns						

Medias (n = 4) ± desviación estándar. Letras minúsculas indican el efecto de la interacción (HMA\*P). Letras mayúsculas en la fila indican el efecto de consorcios (HMA). Letras mayúsculas en la columna indican el efecto de niveles de fósforo (P). La significancia se indica como: ns: no significativo, \*: significativo a P ≤ 0.05, \*\*: significativo a P ≤ 0.01, \*\*\*: significativo a P ≤ 0.001.

Means (n = 4) ± standard deviation. Lower case letters indicate the effect of the interaction (HMA\*P). Capital letters in the row indicate the consortium effect (HMA). Capital letters in the column indicate the effect of phosphorus (P) levels. Significance is indicated as: ns: not significant, \*: significant at P ≤ 0.05, \*\*: significant at P ≤ 0.01, \*\*\*: significant at P ≤ 0.001.

con HMA está relacionada por un estado nutricional favorecido por la simbiosis micorrícica y el estímulo de fitohormonas (Oliveira *et al.*, 2016) aunque, también involucra mecanismos no nutricionales como la capacidad de asimilación de CO<sub>2</sub> en la fotosíntesis (Pan *et al.*, 2020). En cuanto a los niveles de fósforo, la aplicación de 59 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, generó el mayor volumen de raíz con 1.48 cm<sup>3</sup> (Tabla 3). Por tanto, la inoculación de consorcios de HMA permite usar dosis de fósforo menores a la convencional y obtener los mismos resultados. Según Smith *et al.* (2011), la producción de biomasa, también depende de la capacidad de la planta para generar volumen radicular y tener una adecuada absorción de agua y nutrientes. Sin embargo, la simbiosis de HMA no siempre favorece el crecimiento radicular en las plantas, depende de las especies utilizadas y la planta hospedera. Al respecto, Yao *et al.* (2009) observaron que las especies de HMA *Glomus mosseae* y *G. caledonium* redujeron significativamente el crecimiento radicular en plantas de *Poncirus trifoliata* L. pero, *Gigaspora margarita* y *G. versiforme* influyeron positivamente. Este estudio sugiere que tal comportamiento, se atribuye a los mecanismos que las plantas pueden tener sobre la regulación de fitohormonas (Jiang, 2007), sin embargo, también está involucrada la capacidad y eficiencia de la colonización entre los simbioses (Giovannini *et al.*, 2020).

Para evaluar la proporción de biomasa por encima y por debajo del suelo en las plantas de *S. rebaudiana*, se evaluó la relación raíz/brote, la cual mostró que las plantas inoculadas con consorcios de HMA se diferenciaron (P ≤ 0.05) de las plantas testigo por tener valores bajos en este índice (Tabla 3), lo cual indica, que la simbiosis propició una proporción significativamente mayor de brotes en la parte aérea (hojas y tallo) que de raíces. Al respecto, Smith *et al.* (2011) observaron que las plantas colonizadas por HMA poseen una relación raíz/brote más baja. Por el contrario, el aumento de la relación raíz/brote en las plantas no inoculadas, sugiere el rechazo de la hipótesis de que las plantas con una mayor proporción de raíz tienen más posibilidad de obtener el mayor beneficio de crecimiento (Maherali, 2014). Es decir, aún con una menor relación raíz/brote, con la ayuda de los HMA, las plantas podrían absorber los nutrientes del suelo de manera más eficiente, ahorrar energía y carbono para aumentar al mismo tiempo el crecimiento de los brotes (Zhu *et al.*, 2017).

### Producción de biomasa

La respuesta de las plantas de *S. rebaudiana* en la producción de biomasa seca, se determinó a los 120 ddt. El efecto individual de los consorcios nativos de HMA y los niveles de fósforo presentaron diferencias estadísticas (P ≤ 0.05) en la biomasa seca de hojas y de raíz, mientras que, la interacción



entre los dos factores (HMA\*P) produjo diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en la biomasa seca del tallo y total. El consorcio RC incrementó la biomasa seca de hoja en un 60 % en comparación a plantas testigo, registrando en promedio 21.62 contra 8.60 g planta<sup>-1</sup> respectivamente. En cuanto a los niveles de fósforo, la fertilización con 79 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo causó valores ligeramente altos, sin embargo, estadísticamente el efecto fue igual que con 237 y 316 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo (Tabla 4). La biomasa seca del tallo fue mayor en los tratamientos TZ y CY con 79 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo que produjeron 9.81 y 9.46 g planta<sup>-1</sup> respectivamente, aunque, estadísticamente, no fueron diferentes con RC y TZ+237 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo y con CY+316 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, pero si marcaron diferencia frente al Testigo+0 y Testigo+79 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> suelo, que solo generaron 1.50 y 1.89 g planta<sup>-1</sup> respectivamente (Tabla 4). Independientemente del nivel de fósforo aplicado,

la simbiosis de los HMA impulsó la respuesta en esta variable. En *S. rebaudiana*, la biomasa de la parte aérea (hojas y tallo) es la parte más importante en el cultivo, ya que es donde se concentra la mayor cantidad de estevósido y rebaudiosido-A, que le dan la propiedad dulce a la planta (Wölwer-Rieck, 2012). En ese contexto, el uso de HMA se ha relacionado con el aumento de biomasa, y se atribuye a una mejor respuesta al transporte de nutrientes y agua desde lugares donde la raíz no puede explorar (Tarraf *et al.*, 2015). Además, Tavarini *et al.* (2018) subrayan que, en *S. rebaudiana*, los HMA y niveles bajos de fósforo crean un ambiente idóneo que beneficia la producción de biomasa, por lo que, los resultados de este estudio pueden ser considerados en estrategias de producción de *S. rebaudiana*.

La biomasa seca de raíz fue modulada en gran medida por los consorcios RC, TZ y CY, que mostraron efectos

**Tabla 4.** Efecto de consorcios nativos de HMA y fertilización con fósforo sobre la producción y distribución de biomasa seca de *S. rebaudiana* a los 120 ddt.  
**Table 4.** Effect of native AMF consortia and phosphorus fertilization, on the production and distribution of dry biomass of *S. rebaudiana* at 120 dat.

Biomasa seca (g planta <sup>-1</sup> )	P (mg de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> kg <sup>-1</sup> suelo)	Consorcios de HMA				
		RC	TZ	CY	Testigo	Media
<b>Hoja</b>	0	11.60 ± 3.97	12.96 ± 3.98	15.63 ± 1.82	4.55 ± 1.05	11.19 C
	79	27.68 ± 2.15	25.85 ± 2.46	27.13 ± 3.77	5.05 ± 0.85	21.43 A
	158	19.65 ± 2.54	14.44 ± 2.25	21.08 ± 1.58	10.98 ± 3.14	16.54 AB
	237	23.59 ± 4.04	24.22 ± 3.19	18.34 ± 2.55	10.48 ± 1.74	19.16 A
	316	25.57 ± 2.37	16.84 ± 1.36	20.21 ± 2.40	11.94 ± 3.03	18.64 A
<b>Media</b>		21.62 A	18.86 A	20.48 A	8.60 B	
Significancia: HMAxP = ns; HMA = ***; P = **						
<b>Tallo</b>	0	4.62 ± 1.36 abc	4.58 ± 1.14 abc	5.41 ± 0.65 abc	1.50 ± 0.28 e	
	79	7.22 ± 0.77 a	9.81 ± 1.13 a	9.46 ± 2.11 a	1.89 ± 0.20 e	
	158	8.17 ± 1.00 a	4.42 ± 0.85 abc	8.10 ± 0.49 a	3.58 ± 0.88 abc	
	237	8.34 ± 1.59 a	9.01 ± 1.83 a	7.10 ± 0.99 a	4.47 ± 1.33 abc	
	316	7.28 ± 0.51 ab	5.41 ± 1.06 abc	7.13 ± 0.98 a	3.98 ± 1.09 abc	
<b>Media</b>		7.13 A	6.64 A	7.44 A	3.08 B	
Significancia: HMAxP = **, HMA = ***; P = ns						
<b>Raíz</b>	0	1.26 ± 0.29	2.10 ± 0.49	1.62 ± 0.10	0.58 ± 0.09	1.39 C
	79	4.04 ± 0.26	4.11 ± 0.49	3.92 ± 0.86	1.38 ± 0.25	3.36 A
	158	3.79 ± 0.26	2.43 ± 0.55	2.90 ± 0.06	0.97 ± 0.13	2.52 AB
	237	3.14 ± 0.23	2.63 ± 0.14	2.27 ± 0.38	1.07 ± 0.26	2.28 AB
	316	4.01 ± 1.27	2.98 ± 0.61	1.84 ± 0.24	2.95 ± 0.75	2.95 A
<b>Media</b>		3.25 A	2.85 A	2.51 A	1.39 B	
Significancia: HMAxP = ns; HMA = ***; P = **						
<b>Total</b>	0	17.47 ± 5.58 b	19.63 ± 5.58 b	22.66 ± 2.39 b	7.01 ± 1.37 d	16.69 C
	79	38.39 ± 2.91 a	42.16 ± 3.97 a	41.05 ± 6.62 a	8.32 ± 1.04 d	32.48 A
	158	31.61 ± 3.80 ab	21.29 ± 3.53 b	32.08 ± 2.03 ab	15.13 ± 2.83 bc	25.03 AB
	237	35.07 ± 5.63 a	38.97 ± 4.60 a	27.71 ± 3.56 ab	16.02 ± 4.44 bc	29.44 A
	316	36.86 ± 3.29 a	25.23 ± 2.18 b	29.18 ± 3.59 ab	18.87 ± 4.86 b	27.54 A
<b>Media</b>		31.88 A	29.46 A	30.54 A	13.07 B	
Significancia: HMAxP = *; HMA = ***; P = *						

Medias (n = 4) ± desviación estándar. Letras minúsculas indican el efecto de la interacción (HMA\*P). Letras mayúsculas en la fila indican el efecto de consorcios (HMA). Letras mayúsculas en la columna indican el efecto de niveles de fósforo (P). La significancia se indica como: ns: no significativo, \*: significativo a  $P \leq 0.05$ , \*\*: significativo a  $P \leq 0.01$ , \*\*\*: significativo a  $P \leq 0.001$ .

Means (n = 4) ± standard deviation. Lower case letters indicate the effect of the interaction (HMA\*P). Capital letters in the row indicate the consortium effect (HMA). Capital letters in the column indicate the effect of phosphorus (P) levels. Significance is indicated as: ns: not significant, \*: significant at  $P \leq 0.05$ , \*\*: significant at  $P \leq 0.01$ , \*\*\*: significant at  $P \leq 0.001$ .

similares sobre la variable, pero aumentaron el peso seco de raíz 58 % con respecto a plantas sin HMA (Tabla 4). Por otro lado, el efecto individual del factor fósforo mostró el mayor peso seco de raíz con 316 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, no obstante, este resultado no fue significativamente diferente al reducir el nivel de fósforo a 79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo.

El incremento de la biomasa seca de hoja influye sobre el peso de la biomasa seca total. El tratamiento TZ+79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, promovió el mayor aumento de biomasa seca total en un 3 % en comparación a CY y 9 % en comparación a RC con el mismo nivel de fósforo, que fueron el segundo y tercer mejor tratamiento en esta variable, respectivamente. En conjunto, estos resultados demostraron que la simbiosis de los consorcios nativos de HMA condujo a una producción mejorada de biomasa seca aérea en *S. rebaudiana* a los 120 ddt, por lo que, la fertilización convencional (316 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo) resulta en un alto costo de producción y uso desmedido de fertilizantes químicos. En ese marco, estudios han reportado que las aplicaciones de HMA como bioestimulante, presenta incrementos de biomasa seca en cultivos como *Cucumis sativus* (Reyes-Pérez *et al.*, 2021), sin embargo, Aguirre-Medina *et al.* (2020) encontraron que en *S. rebaudiana*, la inoculación de *R. intraradices* aumentó la biomasa seca total y el rendimiento de hoja seca. Por otra parte, Vafadar *et al.* (2014) subrayaron la efectividad de la inoculación de HMA para aumentar el peso seco en *S. rebaudiana*. No obstante, Mandal *et al.* (2013) observaron que el aumento de la biomasa seca en plantas inoculadas con HMA es mayor que en plantas no inoculadas cuando se fertiliza con 50 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, por lo que, el aumento observado se atribuye a la capacidad de traslocación tanto de fósforo, como de otros nutrientes a la planta por parte de los HMA.

### Parámetros fisiológicos

El contenido de clorofila (unidades SPAD) en las hojas de *S. rebaudiana*, se vio influenciado principalmente por efecto de los consorcios de HMA. La inoculación de RC, TZ y CY permitió el aumento de la concentración de clorofila en un 30% con respecto a plantas no colonizadas (Figura 3). Estos resultados son superiores a los reportados por Mostafa (2019) quien observó un aumento del 18 % en el contenido de clorofila (SPAD) en plantas de *S. rebaudiana*, con fertilización completa de NPK. El contenido relativo de clorofila es un indicador importante en la producción de biomasa y fitoquímicos en la planta, absorbe energía solar y la convierte en energía química a través de la fotosíntesis (Pal *et al.*, 2015), lo que explica la relación con el aumento de biomasa en las plantas colonizadas por HMA en este estudio. En contraste, la baja concentración de clorofila reduce la actividad fotosintética y la producción de biomasa de las plantas (Richardson *et al.*, 2002).

En el intercambio de gases, la interacción entre consorcios de HMA y niveles de fósforo, tuvo efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) sobre la tasa de asimilación de  $CO_2$  (fotosíntesis). Las plantas tratadas con RC+79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, registraron la tasa fotosintética más alta con 6.97  $\mu mol$   $CO_2$   $m^{-2} s^{-1}$ ,

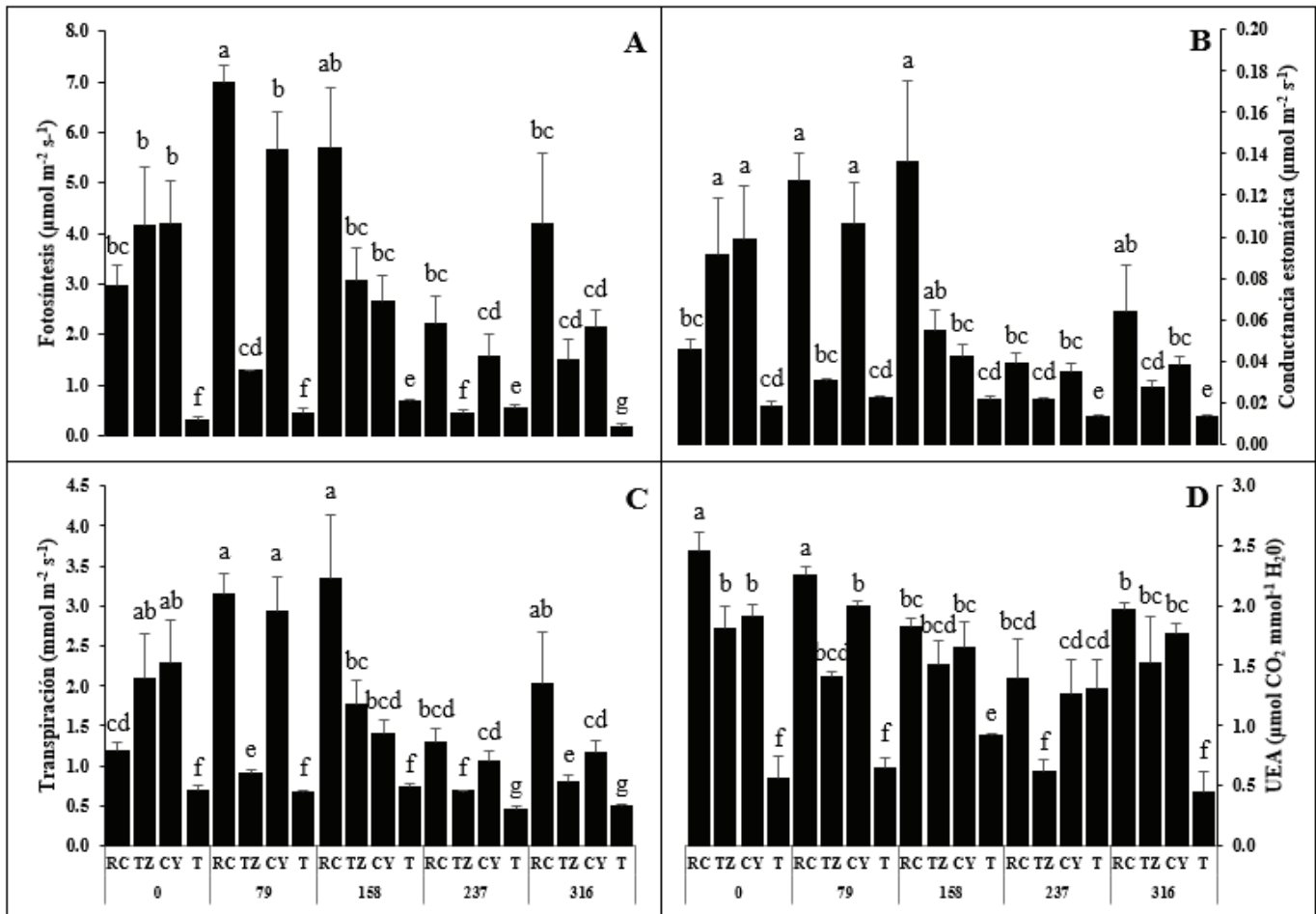
que estuvo por encima del tratamiento convencional (T+316 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo) con 0.18  $\mu mol$   $CO_2$   $m^{-2} s^{-1}$  (Figura 4A). En este contexto, el tratamiento RC+79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, también produjo mayor biomasa seca total que T+316 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, esto podría explicar parcialmente por qué RC+25 % P registró una tasa fotosintética más alta que T+100 % P. Por otra parte, se observó una disminución de la actividad fotosintética en los tratamientos con más del 50 % de fósforo aplicado. Es decir, los altos niveles de fósforo limitaron la tasa de asimilación de  $CO_2$  aún con la inoculación de RC, TZ o CY.

Estos resultados fueron superiores a los observados por Cauch-Cauch *et al.* (2018) quienes reportaron 5.41  $\mu mol$   $CO_2$   $m^{-2} s^{-1}$  como la tasa de asimilación de  $CO_2$  más alta en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *Rhizophagus intraradices*. En este sentido, es probable que el inóculo compuesto de consorcios nativos de HMA, propicie beneficios múltiples en la fisiología de las plantas. En este estudio, la optimización de la fotosíntesis podría estar relacionada con el área foliar producida, que mejora la intercepción y la utilidad de la luz y beneficia la asimilación fotosintética (Tóth *et al.*, 2002). La conductancia estomática mostró una tendencia similar a la fotosíntesis, es decir, fue menor en los tratamientos con 237 y 316 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo respectivamente (Figura 4B).

Los tratamientos RC+158, RC+79 y CY+79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo con 0.14, 0.13 y 0.11  $mmol$   $H_2O$   $m^{-2} s^{-1}$  respectivamente, fueron los que reflejaron los valores más altos de conductancia estomática, e incluso de transpiración con 3.33, 3.15 y 2.92  $mmol$   $H_2O$   $m^{-2} s^{-1}$  respectivamente (Figura 4C). De acuerdo con Garruña-Hernández *et al.* (2014), la conductancia estomática tiene un comportamiento directamente proporcional a la transpiración, por lo tanto, esto explica el paralelismo observado entre estas dos variables fisiológicas. Además, se ha reportado que una transpiración más alta en las plantas colonizadas por HMA, es consistente con las tasas de conductancia estomática (Abdel-Fattah *et al.*, 2014). Por otro lado, las plantas testigo no tuvieron relevancia en la actividad de intercambio de gases. Por lo tanto, es evidente que el efecto de RC+79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, reguló la apertura estomática y la transpiración, mejorando la utilización de agua por parte de las plantas, mientras ésta, asimilaba la mayor cantidad de  $CO_2$ . Al respecto, se ha observado un aumento significativo en el transporte de fósforo por las hifas hacia la planta, cuando la simbiosis de HMA altera positivamente el comportamiento estomático (Shu *et al.*, 2014).

El uso eficiente del agua instantáneo a escala foliar (UEA), se calculó mediante la relación  $\mu mol$   $CO_2$  (tasa de fotosíntesis) /  $mmol$   $H_2O$  (tasa de transpiración). Los tratamientos RC+0 y RC+79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, mostraron el mejor UEA con 2.45 y 2.25  $\mu mol$   $CO_2$   $mmol^{-1}$   $H_2O$  respectivamente (Figura 4D). Por lo tanto, resultaron con la capacidad de limitar la pérdida de agua, mientras se mantenía la absorción neta de carbono en las hojas de *S. rebaudiana* al momento de la medición.

El efecto de la simbiosis sobre el UEA depende en gran medida de la especie de HMA involucrada, sin correlacionar



**Figura 4.** A) Fotosíntesis, B) conductancia estomática, C) Transpiración y D) uso eficiente del agua (UEA), en plantas de *S. rebaudiana*, inoculadas con consorcios de HMA (RC, TZ, CY y T) y fertilizadas con niveles de fósforo (0, 79, 158, 237 y 316 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo) a los 120 ddt. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , prueba de Tukey),  $n = 4$ .

**Figure 4.** A) Photosynthesis, B) stomatal conductance, C) Transpiration and D) efficient use of water (UEA), in *S. rebaudiana* plants, inoculated with AMF consortia (RC, TZ, CY and T) and fertilized with phosphorus levels (0, 79, 158, 237 and 316 mg of  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  soil) at 120 dat. Different letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ , Tukey's test),  $n = 4$ .

su porcentaje de colonización (Ruiz-Lozano *et al.*, 2010); sin embargo, hay varios parámetros fisiológicos y bioquímicos modulados por los HMA que están involucrados en la regulación del UEA además de la conductancia estomática (Ruiz-Lozano *et al.*, 2010; Augé *et al.*, 2008).

## CONCLUSIONES

La fertilización con 79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo (25 % P de la fertilización convencional) en sinergia con la inoculación del consorcio nativo RC, resultó suficiente para mejorar la arquitectura aérea de las plantas en términos de altura y diámetro del tallo, sin embargo, los tres consorcios (RC, TZ y CY) promovieron mayor número de ramificaciones en comparación con plantas no inoculadas, lo que sugiere mejores resultados en el crecimiento vegetativo de *S. rebaudiana*. El efecto de la combinación de RC, TZ y CY con 25 % de fósforo sobre la producción de biomasa seca total, fue igual que con 100 %, por lo tanto, la inoculación de consorcios de HMA permite reducir los niveles de fertilización con fósforo en *S. rebaudiana*. Además, 79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo, mejoró la colo-

nización micorrícica. Así mismo, RC+79 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  suelo mejoró la tasa de fotosíntesis y el uso eficiente del agua. En conjunto, nuestros resultados demuestran el potencial de los consorcios nativos HMA evaluados. Por lo tanto, pueden considerarse un biofertilizante válido para el cultivo de *S. rebaudiana*, ya que permite aplicar menor cantidad de fertilizante, lo que conduce a sistemas agrícolas más sostenibles.

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de posgrado. Al programa de Doctorado en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable del Tecnológico Nacional de México, campus Conkal y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento brindado para la realización del proyecto.

## REFERENCIAS

Augé, R. M., Toler, H. D., Sams, C. E. y Nasim, G. 2008. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash

- leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza*. 18(3): 115-121.
- Abdel-Fattah, G. M., Asrar, A. A., Al-Amri, S. M. y Abdel-Salam, E. M. 2014. Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilization on the gas exchange, growth and phosphatase activity of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Photosynthetica*. 52(4): 581-588.
- Adolfsson, L., Solymosi, K., Andersson, M. X., Keresztes, Á., Uddling, J., Schoefs, B. y Spetea, C. 2015. Mycorrhiza symbiosis increases the surface for sunlight capture in *Medicago truncatula* for better photosynthetic production. *PLoS One*. 10(1): e0115314.
- Aguirre-Medina, J. F., Bartolón-Morales, F. R., Martínez-Solis, M., Cadena-Iñiguez, J. y Martínez-Sias, V. A. 2020. Growth and sweetener content in *Stevia rebaudiana* Bert. biofertilized with *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Sm.) Walker ted y Schüßler, and *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg y Döbereiner in a substrate with bovine manure added. *Japan Journal of Research*. 1(3): 1-5.
- Ahmad, J., Khan, I., Blundell, R., Azzopardi, J. y Mahomoodally, M. F. 2020. *Stevia rebaudiana* Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends in Food Science & Technology*. 100: 177-189.
- Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. 2003. Aplicación de fósforo e inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y estado nutricional de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq. *Terra Latinoamericana*. 21(1): 91-99.
- Alvarado Carrillo, M., Díaz Franco, A. y Peña del Río, M. D. 2014. Productividad de tomate mediante micorriza arbuscular en agricultura protegida. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 5(3): 513-518.
- Arizaleta, M. y Pire, R. 2008. Respuesta de plántulas de cafeto al tamaño de la bolsa y fertilización con nitrógeno y fósforo en vivero. *Agrociencia*. 42(1): 47-55.
- Aroca, R., Ruiz-Lozano, J. M., Zamarreño, Á. M., Paz, J. A., García-Mina, J. M., Pozo, M. J. y López-Ráez, J. A. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. *Journal of Plant Physiology*. 170(1): 47-55.
- Balergue, C., Chabaud, M., Barker, D. G., Bécard, G. y Rochange, S. F. 2013. High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Frontiers in plant science*. 4(426): 1-15.
- Bécard, G. y Piché, Y. 1992. Establishment of Vesicular-arbuscular Mycorrhiza in Root Organ Culture: Review and Proposed Methodology. *Methods in microbiology*. 24: 89-108.
- Brandle, J. E. y Telmer, P. G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*. 68(14): 1855-1863.
- Cauich-Cauich, R., Pérez Gutiérrez, A., Lozano Contreras, M. G., Garruña, R. y Ruiz Sánchez, E. 2018. Productividad de *Stevia rebaudiana* Bertoni con diferentes láminas de riego e inoculantes microbianos. *Nova Scientia*. 10(20): 30-46.
- Ceunen, S. y Geuns, J. M. 2013. Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function. *Journal of Natural Products*. 76(6): 1201-1228.
- Díaz Franco, A., Magallanes Estala, A., Aguado Santacruz, A. y Hernández Mendoza, J. L. 2015. Respuesta de la soya a inoculantes microbianos en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6(2): 227-238.
- Dissanayaka, D. M., Ghahremani, M., Siebers, M., Wasaki, J. y Plaxton, W. C. 2021. Recent insights into the metabolic adaptations of phosphorus-deprived plants. *Journal of Experimental Botany*. 72(2): 199-223.
- Douds Jr, D. D., Lee, J., Rogers, L., Lohman, M. E., Pinzon, N. y Ganser, S. 2012. Utilization of inoculum of AM fungi produced on-farm for the production of *Capsicum annum*: a summary of seven years of field trials on a conventional vegetable farm. *Biological Agriculture & Horticulture*. 28(2): 129-145.
- Eun-Hwa, L., Ju-Kyeong, E., Kang-Hyeon, K. y Ahn-Heum, E. 2013. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. *Mycobiology*. 41(3): 121-125.
- Durán García, R. y García Contreras, G. 2010. Distribución espacial de la vegetación. En: Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. R. Durán y M. Méndez (ed.), pp131-135 CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.
- Garruña-Hernández, R., Orellana, R., Larque-Saavedra, A. y Canto, A. 2014. Understanding the physiological responses of a tropical crop (*Capsicum chinense* Jacq.) at high temperature. *PLoS One*. 9(11): e111402.
- Gerdemann, J. W. y Nicolson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46(2): 235-244.
- Giovannini, L., Palla, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A. y Giovannetti, M. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. *Agronomy*. 10(106): 1-14.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist*. 84(3): 489-500.
- Guleria, P. y Kumar Yadav, S. 2013. Agrobacterium mediated transient gene silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: insights into steviol glycoside biosynthesis pathway. *PLoS One*. 8(9): e74731.
- Herrera-Parra, E., Ramos-Zapata, J., Basto-Pool, C. y Cristóbal-Alejo, J. 2021. Sweet pepper (*Capsicum annum*) response to the inoculation of native arbuscular mycorrhizal fungi and the parasitism of root-knot *Meloidogyne incognita*. *Revista Bio Ciencias*. 8: e982.
- Holbrook, N. M. y Zwieniecki, M. A. 2011. Stomatal control and Water transport in the Xylem. En: Vascular transport in plants. N. M. Holbrook and M. Zwieniecki (ed.), pp 152-169. Elsevier. Academic Press., Massachusetts.
- Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N. P. y Fu, X. 2007. Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 145(4): 1460-1470.
- Kouadio, A. N., Nandjui, J., Krou, S. M., Séry, D. J. M., Nelson, P. N. y Zézé, A. 2017. A native arbuscular mycorrhizal fungus inoculant outcompetes an exotic commercial species under two contrasting yam field conditions. *Rhizosphere*. 4: 112-118.
- Kothe, E. y Turnau, K. 2018. Mycorrhizosphere communication: Mycorrhizal fungi and endophytic fungus-plant interactions. *Frontiers in Microbiology*. 9: 3015.
- Leos-Escobedo, L., García-Carrillo, M., Delgadillo-Martínez, J., Valenzuela-García, A., Angulo-Castro, A., Preciado-Rangel, P. y Rueda-Puente, E. O. 2022. Consorcios de hongos



- micorrízicos y rizobacterias en el control biológico de *Phytophthora capsici* en cultivares de *Capsicum annum*. *Biocercia*. 24(1): 30-37.
- López-Ráez, J. A., Pozo, M. J. y García-Garrido, J. M. 2011. Strigolactones: a cry for help in the rhizosphere. *Botany*. 89(8): 513-522.
- López-Ráez, J. A. y Pozo, M. J. 2013. Chemical signalling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Biotechnological applications. En: *Symbiotic Endophytes*. R. Aroca (ed.), pp 215-232. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Maherali, H. 2014. Is there an association between root architecture and mycorrhizal growth response?. *New Phytologist*. 204(1): 192-200.
- Maniruzzaman, M., Chowdhury, T., Rahman, M., A. y Chowdhury, M., A., H. 2017. Phosphorus use efficiency and critical P content of stevia grown in acid and non-calcareous soils of Bangladesh. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries*. 4(2): 55-68.
- Mandal, S., Evelin, H., Giri, B., Singh, V. P. y Kapoor, R. 2013. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. *Applied Soil Ecology*. 72: 187-194.
- Mandal, S., Upadhyay, S., Singh, V. P. y Kapoor, R. 2015. Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: a concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 89: 100-106.
- Márdero, S., Nickl, E., Schmook, B., Schneider, L., Rogan, J., Christman, Z. y Lawrence, D. 2012. Sequías en el sur de la península de Yucatán: análisis de la variabilidad anual y estacional de la precipitación. *Investigaciones Geográficas*. 78: 19-33.
- Markwell, J., Osterman, J. C. y Mitchell, J. L. 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research*. 46(3): 467-472.
- Mostafa, H. S. 2019. Impact of NPK fertilization and lithovit rates on growth, yield components and chemical constituents of *Stevia rebaudiana* Bert. *Plant. Middle East Journal of Applied Sciences*. 9(02): 412-420.
- Ni, J., Gao, C., Chen, M. S., Pan, B. Z., Ye, K. y Xu, Z. F. 2015. Gibberellin promotes shoot branching in the perennial woody plant *Jatropha curcas*. *Plant and Cell Physiology*. 56(8): 1655-1666.
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U. y Reinhardt, D. 2014. Correction: Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS One*. 10(4): e0127472.
- Oliveira, R. S., Ma, Y., Rocha, I., Carvalho, M. F., Vosátka, M. y Freitas, H. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi are an alternative to the application of chemical fertilizer in the production of the medicinal and aromatic plant *Coriandrum sativum* L. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 79(7): 320-328.
- Pal, P. K., Prasad, R. y Singh, R. D. 2015. Evaluating the non-destructive method for determining the chlorophyll and nitrogen content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaf. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 149(1): 131-135.
- Pan, J., Huang, C., Peng, F., Zhang, W., Luo, J., Ma, S. y Xue, X. 2020. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting bacteria (PGPR) inoculations on *Elaeagnus angustifolia* L. in saline soil. *Applied Sciences*. 10(3): 945.
- Phillips, J. M. y Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55(1): 158-161.
- Quiñones-Aguilar, E. E., López-Pérez, L. y Rincón-Enríquez, G. 2014. Dinámica del crecimiento de papaya por efecto de la inoculación micorrízica y fertilización con fósforo. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 20(2): 223-237.
- Ramírez-Jaramillo, G. y Lozano-Contreras, M. G. 2017. La producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni en México. *AgroProductividad*. 10(8): 84-90.
- Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F. y Sakr, S. 2015. Multiple pathways regulate shoot branching. *Frontiers in Plant Science*. 5: 741.
- Rapparini, F., Llusià, J. y Peñuelas, J. 2008. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisia annua* L. *Plant Biology*. 9(S 01): e20-e32.
- Reyes-Pérez, J. J., Rivero-Herrada, M., Andagoya Fajardo, C. J., Beltrán-Morales, F. A., Hernández-Montiel, L. G., García Liscano, A. E. y Ruiz-Espinoza, F. H. 2021. Emergencia y características agronómicas del *Cucumis sativus* a la aplicación de quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos. *Biocercia*. 23(3): 38-44.
- Reyes-Ramírez, A., López-Arcos, M., Ruiz-Sánchez, E., Latournerie-Moreno, L., Pérez-Gutiérrez, A., Lozano-Contreras, M. G. y Zavala-León, M. J. 2014. Efectividad de inoculantes microbianos en el crecimiento y productividad de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia*. 48(3): 285-294.
- Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*. 28(9): 897-906.
- Richardson, A. D., Duigan, S., P. y Berlyne, G. P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*. 153(1): 185-194.
- Ruiz-Lozano, J. M. y Aroca, R. 2010. Host response to osmotic stresses: stomatal behaviour and water use efficiency of arbuscular mycorrhizal plants. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. H. Koltai y Y. Kapulnik (ed.), pp 239-256. Springer, Dordrecht.
- Sarmiento-López, L. G., López-Meyer, M., Sepúlveda-Jiménez, G., Cárdenas, L. y Rodríguez-Monroy, M. 2020. Photosynthetic performance and stevioside concentration are improved by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Stevia rebaudiana* under different phosphate concentrations. *PeerJ*. 8: e10173.
- Sarmiento-López, L., G., López-Meyer, M., Sepúlveda-Jiménez, G., Cárdenas, L. y Rodríguez-Monroy, M. 2021. Arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Stevia rebaudiana* increases trichome development, flavonoid and phenolic compound accumulation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 31: 101889.
- Sieverding, E. 1990. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 29(1-4): 369-390.
- Shu, B., Wang, P. y Xia, R. X. 2014. Effects of mycorrhizal fungi on phytate-phosphorus utilization in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 36(4): 1023-1032.

- Smith, S. E., Jakobsen, I., Gronlund, M. y Smith, F. A. 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(3): 1050-1057.
- Tarraf, W., Ruta, C., De Cillis, F., Tagarelli, A., Tedone, L. y De Mastro, G. 2015. Effects of mycorrhiza on growth and essential oil production in selected aromatic plants. *Italian Journal of Agronomy*. 10(3): 160-162.
- Tavarini, S., Passera, B., Martini, A., Avio, L., Sbrana, C., Giovannetti, M. y Angelini, L. G. 2018. Plant growth, steviol glycosides and nutrient uptake as affected by arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorous fertilization in *Stevia rebaudiana* Bert. *Industrial Crops and Products*. 111: 899-907.
- Tavarini, S., Pagano, I., Guidi, L. y Angelini, L. G. 2015. Impact of nitrogen supply on growth, steviol glycosides and photosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 150(5): 953-962.
- Tedone, L., Ruta, C., De Cillis, F. y De Mastro, G. 2020. Effects of *Septoglomus viscosum* inoculation on biomass yield and steviol glycoside concentration of some *Stevia rebaudiana* chemotypes. *Scientia Horticulturae*. 262: 109026.
- Tekaya, M., Mechri, B., Mbarki, N., Cheheb, H., Hammami, M. y Attia, F. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* influences key physiological parameters of olive trees (*Olea europaea* L.) and mineral nutrient profile. *Photosynthetica*. 55(2): 308-316.
- Tóth, V., R., Mészáros, I., Veres, S. and Nagy, J. 2002. Effects of the available nitrogen on the photosynthetic activity and xanthophyll cycle pool of maize in field. *Journal of Plant Physiology*. 159(6): 627-634.
- Trejo, D., Ferrera-Cerrato, R., García, R., Varela, L., Lara, L. y Alarcón, A. 2011. Efectividad de siete consorcios nativos de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de café en condiciones de invernadero y campo. *Revista Chilena de Historia Natural*. 84(1): 23-31.
- Uçar, E., Turgut, K., Özyiğit, Y., Özek, T. and Özek, G. 2018. The effect of different nitrogen levels on yield and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). *Journal of Plant Nutrition*. 41(9): 1130-1137.
- Vafadar, F., Amooaghaie, R. y Otroshy, M. 2014. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Plant Interactions*. 9(1): 128-136.
- Vosátka, M., Látr, A., Gianinazzi, S. y Albrechtová, J. 2012. Development of arbuscular mycorrhizal biotechnology and industry: current achievements and bottlenecks. *Symbiosis*. 58(1): 29-37.
- Waller, L. P., Felten, J., Hiiesalu, I. y Vogt-Schilb, H. 2018. Sharing resources for mutual benefit: crosstalk between disciplines deepens the understanding of mycorrhizal symbioses across scales. *New Phytologist*. 217(1): 29-32.
- Wölwer-Rieck, U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(4): 886-895.
- Wright, D. P., Scholes, J. D., Read, D. J. and Rolfe, S. A. 2005. European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytologist*. 167(3): 881-896.
- Yao, Q., Wang, L. R., Zhu, H. H. y Chen, J. Z. 2009. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on root system architecture of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. *Scientia Horticulturae*. 121(4): 458-461.
- Zhu, X. Q., Tang, M. y Zhang, H. Q. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced the growth, photosynthesis, and calorific value of black locust under salt stress. *Photosynthetica*. 55(2): 378-385.

# Efecto de bioestimulantes microbianos en frutos de chile morrón y jitomate producidos en macrotúnel

Effect of microbial biostimulants on bell pepper and tomato fruits produced in macrotunnels

Jacel Adame-García<sup>1</sup>, Félix David Murillo-Cuevas<sup>1\*</sup>, Héctor Cabrera-Mireles<sup>2</sup>, Jazmín Villegas-Narváez<sup>1</sup>, Adriana Elena Rivera-Meza<sup>1</sup>, Andrés Vásquez-Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Úrsulo Galván. Carretera Cd Cardel-Chachalacas km 4.5, Úrsulo Galván, Veracruz, México. CP. 91667.

<sup>2</sup> Campo Experimental Cotaxtla-INIFAP. Carretera Federal Veracruz-Córdoba km 35.4, Medellín de Bravo, Veracruz, México. CP. 94992.

## RESUMEN

La producción intensiva de vegetales ha provocado dependencia excesiva de la fertilización química, lo cual ha generado problemas ambientales y de inocuidad de los alimentos. Una opción para reducir la cantidad de fertilizantes sintéticos es el manejo de nutrientes mediante inoculaciones microbianas. El objetivo fue evaluar el efecto de dos bioestimulantes a base de *Trichoderma* spp. y uno de *Bacillus* spp. en el diámetro, longitud y peso de frutos de chile morrón y jitomate en condiciones de macrotúnel. Los tratamientos fueron: Genifix<sup>®</sup>, T22<sup>®</sup>, Mix<sup>®</sup> y testigo. Se utilizó un diseño experimental en bloques al azar con cuatro repeticiones. Se utilizaron tres cortes de frutos por cultivo. Las variables de respuesta fueron: peso, diámetro y longitud de fruto, además del peso de 20 frutos elegidos al azar. Los frutos obtenidos con el tratamiento Genifix fueron de mayor tamaño y peso, con diferencias significativas al resto de los tratamientos. El T22 y Mix mostraron un efecto significativo con frutos más grandes y pesados en comparación a frutos testigo en la mayoría de los cortes. Los bioestimulantes evaluados mejoraron el tamaño y peso de frutos de chile morrón y jitomate en plantas con un manejo mínimo tradicional de fertilización en condiciones de macrotúnel.

**Palabras clave:** Genifix, *Bacillus*, *Trichoderma*, hortalizas, agricultura protegida.

## ABSTRACT

The intensive production of vegetables has caused excessive dependence on chemical fertilization, which has generated environmental and food safety problems. An option to reduce the amount of synthetic fertilizers is the management of nutrients through microbial inoculations. The objective of this study was to evaluate the effect of two biostimulants based on *Trichoderma* spp. and one from *Bacillus* spp., on the diameter, length and weight of bell pepper and tomato fruits under macrotunnel conditions. The treatments were: Genifix<sup>®</sup>, T22<sup>®</sup>, Mix<sup>®</sup> and control (blank). A completely randomized block design with four repetitions was used. Three harvests were made per crop. The response variables

were: weight, diameter and fruit length, in addition to the weight of 20 fruits chosen at random. The fruits obtained with the Genifix treatment were larger and heavier, with significant differences from the rest of the treatments. The T22 and Mix also showed a significant effect on the development of larger and heavier fruits in relation to the control in most harvests. The evaluated biostimulants improved the size and weight of bell pepper and tomato fruits in plants with minimal traditional fertilization management under macrotunnel conditions.

**Keywords:** Genifix, *Bacillus*, *Trichoderma*, vegetables, protected agriculture.

## INTRODUCCIÓN

Los vegetales son buenos proveedores de vitaminas, minerales, antioxidantes (polifenoles y carotenoides) y fibra dietética, lo cual mejora la calidad nutricional en la dieta de las personas que los consumen (Hervert-Hernández *et al.*, 2011). Además, son fuente de fitonutrientes y fitonutracéuticos, que son sustancias que tienen propiedades protectoras o preventivas de enfermedades, y se asocian con la prevención de ciertos padecimientos crónicos, incluidas las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y la osteoporosis (Chen *et al.*, 2007; Ramya y Patel, 2019).

La producción intensiva de los productos vegetales ha provocado una dependencia excesiva de la fertilización química, ya que es una forma rápida de proporcionar a las plantas los macro y micronutrientes necesarios; sin embargo, en su mayoría es ineficiente, ya que gran parte del fertilizante aplicado se escapa al medio ambiente, se lava del suelo por la escorrentía y muchas veces pueden dejar de estar disponibles para las plantas (Sánchez *et al.*, 2001; Daverede *et al.*, 2004; Benbi *et al.*, 2013). Además, la aplicación excesiva de fertilizantes químicos genera problemas de inocuidad y deterioro de la calidad de los alimentos, como la acumulación de nitratos en los productos vegetales que puede provocar metahemoglobinemia en menores (Ye *et al.*, 2020).

Debido a estos problemas se han sugerido y probado métodos alternativos de fertilización orgánica, tales como

\*Autor para correspondencia: Félix David Murillo-Cuevas  
 Correo electrónico: felix.mc@ugalvan.tecnm.mx

Recibido: 12 de junio de 2022

Aceptado: 19 de septiembre de 2022

los abonos orgánicos (Murillo *et al.*, 2016; Reyes-Pérez *et al.*, 2018; Mendivil-Lugo *et al.*, 2020), bioestimulantes (Torres *et al.*, 2016; Murillo *et al.*, 2021) y microorganismos (Espinosa-Palomeque *et al.*, 2019; Adame-García *et al.*, 2021). Sin embargo, el uso de la fertilización orgánica siempre se asocia con menor rendimiento de los cultivos y, por lo tanto, mayor costo (Ye *et al.*, 2020). De tal forma que, la fertilización química no se puede excluir por completo si se pretende una producción considerable de alimentos. Por tal motivo, una alternativa que se puede utilizar es el manejo integrado de nutrientes, que no pretende eliminar por completo la fertilización química de manera inmediata, sino que sugiere el uso de inoculantes microbianos para reducir la cantidad de fertilizantes aplicados (Ye *et al.*, 2020).

Los bioestimulantes microbianos son productos a base de hongos micorrízicos y no micorrízicos, bacterias endosimbióticas y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Calvo *et al.*, 2014), que se utilizan para mejorar la eficiencia nutricional en las plantas y la calidad del cultivo (du-Jardin, 2015). Estos reducen las enfermedades causadas por fitopatógenos, disminuyendo las fuentes de alimento por competencia de espacio y/o nutrientes, producen compuestos antimicrobianos y estimulan los mecanismos de defensa de las plantas. También, promueven el crecimiento de las plantas, mejoran la calidad de los frutos y aumentan el rendimiento en los cultivos a través de la producción de fitohormonas y disponibilidad de fosfatos y otros minerales necesarios para el metabolismo de las plantas (Rojas-Solís *et al.*, 2013; Ruiz-Cisneros *et al.*, 2019).

El uso de bioestimulantes microbianos en la horticultura ha aumentado el interés por estudiarlos, evaluarlos y conocer sus efectos. En el cultivo de chile, cepas de bacterias *Bacillus* y de hongos *Trichoderma* han sido eficientes para estimular el desarrollo de la raíz, plántula y planta, así como para mejorar la calidad de la fruta (Candelero *et al.*, 2015; Gamboa-Angulo *et al.*, 2020; Adame-García *et al.*, 2021). Además, productos comerciales a base de estos microorganismos también han tenido efectos positivos en la calidad de frutos en condiciones de macrotúnel (Murillo *et al.*, 2021).

En el cultivo de jitomate, cepas de bacterias *Enterobacter* y *Bacillus* incrementan de manera significativa la biomasa, el desarrollo de la planta y el rendimiento del cultivo en condiciones de invernadero (Sánchez *et al.*, 2012), así mismo, aislados de rizobacterias incrementan la biomasa de la parte aérea de las plántulas (Noh *et al.*, 2014). Igualmente, cepas de *B. amyloliquefaciens* incrementan significativamente la altura de la planta, longitud de raíz y el rendimiento del cultivo, además, cepas *B. subtilis* han mostrado efectos positivos en el diámetro y firmeza de los frutos (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2019).

El macrotúnel es un sistema de producción que protege a los cultivos de los efectos que imponen los fenómenos climáticos, además permite el desarrollo de los cultivos en menor tiempo y mejora el rendimiento en menos espacio (Moreno *et al.*, 2011). Sin embargo, es poca la información que se tiene de la producción de hortalizas en este sistema (Velásquez *et al.*, 2014). De tal forma que se considera que

bioestimulantes a base de microorganismos ejercerán un efecto significativo en el tamaño y peso de fruto en los cultivos de chile morrón y jitomate en condiciones protegidas de macrotúnel. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos bioestimulantes comerciales a base de *Trichoderma* spp. y uno nuevo a base de *Bacillus* spp. en el diámetro, longitud y peso de frutos de chile morrón y jitomate en condiciones protegidas de macrotúnel.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el ciclo productivo 2021-2022 en el Tecnológico Nacional de México, Campus Úrsulo Galván en las coordenadas 19° 24' 43.12" latitud norte y 96° 21' 32.12" longitud oeste, ubicado en el municipio de Úrsulo Galván, en la región centro costera de Veracruz. El clima de esta región se clasifica como Aw (tropical húmedo-seco) por el sistema Köppen-Geiger, definido como cálido subhúmedo con lluvias en verano, con un rango de temperatura que oscila entre 24 y 26 °C, y un rango de precipitación entre 1100 y 1300 mm (INAP, 2013).

### Características del macrotúnel

Para el desarrollo del experimento se utilizaron dos macrotúneles, uno para cada cultivo, con dimensiones de 3 m de ancho por 30 m de largo (90 m<sup>2</sup>), forrado con malla antiáfidos. Dentro de los macrotúneles se construyeron dos camas con composta de cachaza mezclada con suelo (1:10) y acolchado blanco-negro, las camas fueron de 90 cm de ancho y 30 cm de altura, separadas una de otra por un callejón de no menos de 40 cm de ancho, el marco de plantación fue de una planta cada 25 cm a tresbolillo, lo cual dio un total de 120 plantas por cama y 240 por macrotúnel. Se utilizó un sistema de riego de cuatro salidas de agua y 30 m de cintilla calibre 6000 para cada cama, conectadas a la línea principal con cuatro válvulas de paso para controlar el riego de cada cultivo.

### Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile morrón variedad Rhino de Lark Seed International® y semillas de jitomate variedad Atrevido F1 de Harris Moran®. Todas las semillas fueron germinadas en charolas e inoculadas directamente con micorrizas (*Rhizophagus intraradices*) de INIFAP antes de ponerlas a germinar en sustrato a base de musgo (*Sphagnum* sp.), para permitir la asociación simbiótica entre el hongo y las raíces lo que ayudará a la planta a captar mayor cantidad de nutrientes y agua.

### Manejo del cultivo

El trasplante del cultivo de chile morrón se realizó el 30 de septiembre 2021 y los cortes de frutos fueron a los 75, 90 y 118 días después del trasplante (DDT). En jitomate el trasplante se llevó a cabo el 05 de noviembre 2021 y los cortes de frutos a los 85, 95 y 106 DDT. En todos los tratamientos por igual se realizó una fertilización de los cultivos mínima tradicional la cual se muestra en la Tabla 1, se aplicó



**Tabla 1.** Fertilización química aplicada al suelo dirigida al cuello de la planta en cada uno de los tratamientos por cultivos.

**Table 1.** Chemical fertilization applied to the soil directed to the neck of the plant in each of the crop treatments.

Ingrediente	Nombre comercial	Dosis
Fósforo/Nitrato	DAP + Urea	1g DAP + 1g Urea en 20 mL
Micronutrientes	Bayfolan®	Foliar 2L ha <sup>-1</sup> en 200L de agua
Boro/Calcio	CaBo Zinc®	Foliar 2L ha <sup>-1</sup> en 200L de agua

en drench (20 mL por planta) a los 20, 50, 90 y 120 DDT. Se realizó la aplicación de ácidos húmicos (Hortihumus®, 10%) a los 15 DDT y posteriormente cada 30 días. Además de aplicaciones foliares de micronutrientes cada 15 días y al inicio de la floración se les aplicó boro/calcio y después cada 20 días hasta concluir el ciclo productivo (Tabla 1).

**Bioestimulantes**

Los bioestimulantes que se utilizaron fueron productos a base de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., los cuales son hongos y bacterias respectivamente. En la Tabla 2 se muestran los tratamientos evaluados: 1) Genifix®, 2) T22®, 3) Mix® y 4) testigo, su composición y dosis de aplicación.

**Tabla 2.** Tratamientos evaluados para determinar el efecto de los bioestimulantes en el diámetro, longitud y peso de fruto de chile morrón y jitomate en condiciones protegidas de macrotúnel.

**Table 2.** Treatments evaluated to determine the effect of biostimulants on the diameter, length and weight of bell pepper and tomato fruit under protected macrotunnel conditions.

Tratamientos	Ingrediente activo	Compañía	Dosis
Genifi®	<i>Bacillus</i> sp. JVN5, <i>B. megaterium</i> strain VVM1, <i>Bacillus</i> sp. FDMC4, <i>B. subtilis</i> strain JAG3, <i>B. megaterium</i> strain EAV2	TecNM, Campus Úrsulo Galván	20 % (v/v)
T22®	<i>Trichoderma harzianum</i> cepa T22	PHC	0.5 % (p/v)
MIX®	<i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. asperellum</i> , <i>T. koningli</i>	Organismos benéficos	0.5 % (p/v)
Testigo	Agua		

**Diseño experimental**

Para cada cultivo se empleó un diseño experimental en bloques completos al azar con cuatro repeticiones distribuidos en dos camas, cada una con cuatro bloques que correspondieron a cada tratamiento y cuatro repeticiones por bloque. En cada bloque experimental los bioestimulantes se aplicaron mensualmente al suelo, dirigidos al cuello de la planta (drench). Todos los tratamientos tuvieron las mismas condiciones de germinación y manejo del cultivo. Las variables de respuesta peso, diámetro (ecuatorial) y longitud (diámetro polar) de fruto se tomaron durante tres cortes de frutos, para lo cual se tomaron cinco frutos al azar por repetición, además se tomó la variable peso total de 20 frutos elegidos al azar por tratamiento.

**Análisis estadístico**

Para comparar el efecto de los bioestimulantes en el peso, diámetro y longitud de fruto, además del peso de los

20 frutos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias de Tukey  $\alpha = 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat versión 2020.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los bioestimulantes registraron un efecto positivo en el peso, diámetro y longitud de frutos de chile morrón en los tres cortes evaluados (Tabla 3). En el primer corte, los frutos de las plantas tratadas con los bioestimulantes fueron significativamente ( $F_{3,196} = 8.66, p = 0.0001$ ) más pesados que los frutos de las plantas testigo (Tabla 3). Las diferencias significativas obtenidas en el segundo ( $F_{3,196} = 14.26, p = 0.0001$ ) y tercer corte ( $F_{3,196} = 17.61, p = 0.0001$ ), mostraron que todos los frutos de las plantas tratadas tuvieron mayor peso en relación a los frutos de las plantas testigo. Además, el producto Genifix® logró frutos de mayor peso en comparación a los productos T22® y Mix® (Tabla 3).

En cuanto al diámetro del fruto, las diferencias significativas en cada uno de los cortes (primero  $F_{3,196} = 9.70, p = 0.0001$ ; segundo  $F_{3,196} = 15.61, p = 0.0001$  y tercero  $F_{3,196} = 18.26, p = 0.0001$ ) indicaron que los frutos de las plantas tratadas fueron superiores a los frutos de las plantas testigo (Tabla 3). En longitud de fruto, las diferencias significativas obtenidas en el primer corte ( $F_{3,196} = 2.40, p = 0.0491$ ), mostraron que los frutos de las plantas con aplicaciones de T22® tuvieron mayor longitud en comparación a los frutos testigo. Para el segundo y tercer corte las diferencias significativas

**Tabla 3.** Efecto de los bioestimulantes en peso (g), diámetro y longitud (cm) de fruto de chile morrón en tres cortes de frutos en condiciones protegidas de macrotúnel.

**Table 3.** Effect of biostimulants on weight (g), diameter and length (cm) of bell pepper fruit in three harvests under protected macrotunnel conditions

Tratamiento	Cortes		
	1	2	3
PESO DEL FRUTO			
Genifix	257.38 ± 5.65 <sup>a</sup>	260.13 ± 5.43 <sup>a</sup>	262.05 ± 4.33 <sup>a</sup>
T22	240.15 ± 5.66 <sup>a</sup>	245.62 ± 4.43 <sup>ab</sup>	235.67 ± 4.33 <sup>b</sup>
Mix	256.68 ± 6.92 <sup>a</sup>	236.85 ± 5.42 <sup>b</sup>	235.58 ± 5.30 <sup>b</sup>
Testigo	215.85 ± 6.92 <sup>b</sup>	216.68 ± 4.43 <sup>c</sup>	213.33 ± 5.30 <sup>c</sup>
C.V. (%)	17.95	14.41	14.02
DIÁMETRO DEL FRUTO			
Genifix	8.29 ± 0.08 <sup>a</sup>	8.82 ± 0.11 <sup>a</sup>	8.42 ± 0.08 <sup>a</sup>
T22	8.19 ± 0.09 <sup>a</sup>	8.60 ± 0.09 <sup>a</sup>	8.30 ± 0.07 <sup>a</sup>
Mix	8.37 ± 0.12 <sup>a</sup>	8.11 ± 0.11 <sup>b</sup>	8.28 ± 0.09 <sup>a</sup>
Testigo	7.59 ± 0.12 <sup>b</sup>	8.02 ± 0.09 <sup>b</sup>	7.58 ± 0.08 <sup>b</sup>
C.V. (%)	9.01	8.10	7.24
LONGITUD DEL FRUTO			
Genifix	8.78 ± 0.62 <sup>ab</sup>	9.07 ± 0.10 <sup>a</sup>	9.87 ± 0.13 <sup>a</sup>
T22	9.92 ± 0.61 <sup>a</sup>	9.23 ± 0.12 <sup>a</sup>	9.29 ± 0.13 <sup>b</sup>
Mix	8.62 ± 0.76 <sup>ab</sup>	8.92 ± 0.11 <sup>a</sup>	9.54 ± 0.16 <sup>ab</sup>
Testigo	7.31 ± 0.74 <sup>b</sup>	8.48 ± 0.10 <sup>b</sup>	8.37 ± 0.15 <sup>c</sup>
C.V. (%)	54.46	8.49	11.14

Literales diferentes indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. Los datos se presentan en  $\bar{X} \pm E.E.$ , C.V. = Coeficiente de Variación, Tukey  $\alpha = 0.05$ .

( $F_{3,16} = 10.50, p = 0.0001$  y  $F_{3,196} = 17.25, p = 0.0001$  respectivamente) señalaron que todos los bioestimulantes incrementaron la longitud de los frutos (Tabla 3). En el tercer corte el Genifix® fue superior al T22° en sus efectos sobre la longitud de los frutos.

Al analizar los tres cortes juntos de chile morrón, se observó que los frutos de las plantas con aplicaciones de bioestimulantes fueron significativamente ( $F_{3,588} = 34.25, p = 0.0001$ ) más pesados que los frutos de las plantas testigo, además, los frutos de plantas con Genifix® fueron los más pesados (Tabla 4). En la variable diámetro, los frutos de plantas tratadas fueron significativamente ( $F_{3,588} = 36.72, p = 0.0001$ ) más anchos que los frutos de las plantas testigo. Los frutos de plantas con Genifix® superaron en diámetro a los frutos de las plantas con Mix® (Tabla 4). Los frutos de plantas con Genifix® y T22° tuvieron la mayor longitud de frutos ( $F_{3,588} = 6.94, p = 0.0001$ ) (Tabla 4).

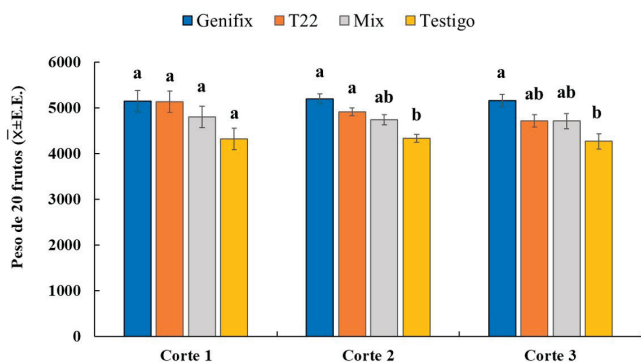
**Tabla 4.** Efecto promedio de los bioestimulante en peso, diámetro y longitud de frutos de chile morrón en un total de tres cortes en condiciones protegidas de macrotúnel.

**Table 4.** Average effect of biostimulants on weight, diameter and length of bell pepper fruits in a total of three harvests under protected macrotunnel conditions.

Tratamiento	Variables de respuesta		
	Peso (g)	Diámetro (cm)	Longitud (cm)
Genifix	259.85 ± 3.02 <sup>a</sup>	8.51 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.24 ± 0.23 <sup>a</sup>
T22	240.48 ± 2.79 <sup>b</sup>	8.36 ± 0.05 <sup>ab</sup>	9.48 ± 0.21 <sup>a</sup>
Mix	243.03 ± 3.42 <sup>b</sup>	8.25 ± 0.06 <sup>b</sup>	9.03 ± 0.26 <sup>ab</sup>
Testigo	215.29 ± 3.23 <sup>c</sup>	7.73 ± 0.06 <sup>c</sup>	8.05 ± 0.25 <sup>b</sup>
C.V. (%)	15.60	8.14	31.77

Literales diferentes indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. Los datos se presentan en  $\bar{X} \pm E.E.$ , C.V. = Coeficiente de Variación, Tukey  $\alpha = 0.05$ .

En cuanto al peso de muestras de 20 frutos de chile morrón (Figura 1), en el primer corte no se registraron diferencias significativas ( $F_{3,6} = 1.99, p = 0.2168$ ), en el segundo las diferencias significativas ( $F_{3,6} = 13.74, p = 0.0043$ ) mostraron que los frutos de plantas con Genifix® y T22° fueron su-



**Figura 1.** Efecto de los bioestimulante en el peso (g) de muestras de 20 frutos de chile morrón en tres cortes de frutos en condiciones protegidas de macrotúnel. Literales diferentes indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos, Tukey  $\alpha = 0.05$ .

**Figure 1.** Effect of biostimulants on the samples weight (g) of 20 bell pepper fruits in three harvests under protected macrotunnel conditions. Different literals indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ) between treatments, Tukey  $\alpha = 0.05$ .

periores a los frutos de las plantas testigo. En el tercer corte, sólo la muestra de 20 frutos de plantas con Genifix® fueron significativamente ( $F_{3,6} = 5.68, p = 0.0346$ ) más pesados que la muestra de 20 frutos de las plantas testigo (Figura 1).

En el cultivo de jitomate, los bioestimulantes también tuvieron un efecto positivo sobre el peso, diámetro y longitud de los frutos (Tabla 5). En el primer corte, los frutos de las plantas con aplicaciones de Genifix® fueron significativamente ( $F_{3,180} = 10.80, p = 0.0001$ ) más pesados que los frutos de los otros tratamientos (Tabla 5). En el segundo corte, sólo plantas con aplicaciones de Genifix® y Mix® tuvieron frutos significativamente más pesados ( $F_{3,452} = 13.17, p = 0.0001$ ) en comparación a los frutos testigo, y en el tercer corte, las diferencias significativas ( $F_{3,461} = 3.83, p = 0.0099$ ) demostraron que únicamente los frutos de las plantas con Genifix® fueron más pesados que los frutos testigo (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efecto de los bioestimulantes en peso (g), diámetro y longitud (cm) de fruto de jitomate en tres cortes de frutos en condiciones protegidas de macrotúnel.

**Table 5.** Effect of biostimulants on tomato fruit weight (g), diameter and length (cm) in three harvests under protected macrotunnel conditions.

Tratamiento	Cortes		
	1	2	3
PESO DEL FRUTO			
Genifix	110.96 ± 4.18 <sup>a</sup>	113.72 ± 5.51 <sup>a</sup>	107.19 ± 1.96 <sup>a</sup>
T22	86.05 ± 4.74 <sup>b</sup>	95.74 ± 2.94 <sup>b</sup>	103.09 ± 1.92 <sup>ab</sup>
Mix	83.15 ± 3.79 <sup>b</sup>	112.80 ± 3.01 <sup>a</sup>	104.48 ± 1.95 <sup>ab</sup>
Testigo	80.53 ± 5.07 <sup>b</sup>	96.02 ± 2.74 <sup>b</sup>	98.15 ± 1.92 <sup>b</sup>
C.V. (%)	32.56	28.25	20.24
DIÁMETRO DEL FRUTO			
Genifix	5.02 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.32 ± 0.05 <sup>a</sup>	5.24 ± 0.06 <sup>a</sup>
T22	4.81 ± 0.10 <sup>ab</sup>	5.00 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.17 ± 0.05 <sup>a</sup>
Mix	4.54 ± 0.11 <sup>bc</sup>	5.22 ± 0.06 <sup>a</sup>	5.12 ± 0.07 <sup>ab</sup>
Testigo	4.42 ± 0.08 <sup>c</sup>	4.99 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.96 ± 0.05 <sup>b</sup>
C.V. (%)	13.82	11.76	11.62
LONGITUD DEL FRUTO			
Genifix	6.68 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.90 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.92 ± 0.08 <sup>a</sup>
T22	6.23 ± 0.17 <sup>ab</sup>	6.56 ± 0.07 <sup>b</sup>	6.61 ± 0.07 <sup>b</sup>
Mix	6.13 ± 0.18 <sup>ab</sup>	6.96 ± 0.08 <sup>a</sup>	6.57 ± 0.09 <sup>bc</sup>
Testigo	5.85 ± 0.13 <sup>b</sup>	6.48 ± 0.08 <sup>b</sup>	6.32 ± 0.07 <sup>c</sup>
C.V. (%)	16.76		12.27

Literales diferentes indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. Los datos se presentan en  $\bar{X} \pm E.E.$ , C.V. = Coeficiente de Variación, Tukey  $\alpha = 0.05$ .

En la Tabla 5 se muestra que algunos bioestimulantes tuvieron un efecto positivo sobre el diámetro y longitud de los frutos de jitomate. En el primer corte los frutos de plantas con Genifix® y T22° fueron significativamente ( $F_{3,180} = 8.84, p = 0.0001$ ) más anchos que los frutos testigo (Tabla 5). En el segundo corte los frutos de plantas tratadas con Genifix® y Mix® fueron significativamente ( $F_{3,452} = 8.78, p = 0.0001$ ) más anchos que los frutos testigo, y en el tercer corte las diferencias significativas ( $F_{3,461} = 4.65, p = 0.0032$ ) fueron de los frutos de plantas con Genifix® y T22°, con los mayores diámetros en comparación a los frutos testigo.

La longitud de frutos de jitomate también fue promovida por algunos de los bioestimulantes (Tabla 5). En el primer corte los frutos de plantas con aplicaciones de Genifix® fueron significativamente ( $F_{3,180} = 5.84, p = 0.0008$ ) más largos que los frutos de las plantas testigo. En el segundo corte los frutos de plantas con bioestimulantes fueron significativamente ( $F_{3,452} = 10.28, p = 0.001$ ) más largos que los frutos testigo, y en el tercer corte los frutos de plantas con aplicaciones de Genifix® y T22® registraron diferencias significativas ( $F_{3,461} = 10.81, p = 0.0001$ ), con frutos más largos en comparación a los frutos de las plantas testigo (Tabla 5).

Al tomar en cuenta los tres cortes juntos de jitomate, los frutos de plantas tratadas con los bioestimulantes mostraron diferencias significativas en peso ( $F_{3,1093} = 23.45, p = 0.0001$ ), diámetro ( $F_{3,1093} = 18.55, p = 0.0001$ ) y longitud ( $F_{3,1093} = 22.02, p = 0.0001$ ) (Tabla 6). Además, los frutos de plantas con aplicaciones de Genifix® superaron en peso, diámetro y altura a los frutos de las plantas tratadas con los otros bioestimulantes (Tabla 6).

**Tabla 6.** Efecto promedio de los bioestimulante en peso, diámetro y longitud de frutos de jitomate en un total de tres cortes en condiciones protegidas de macrotúnel.

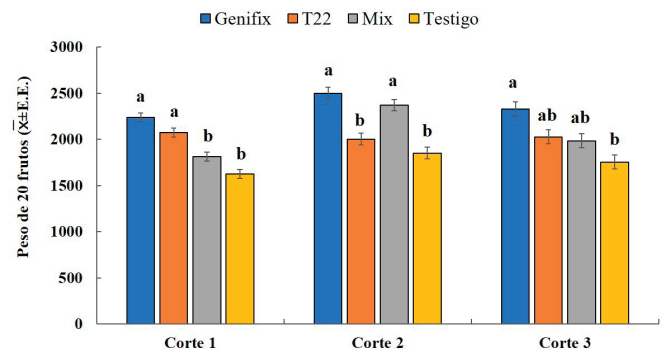
**Table 6.** Average effect of biostimulants on weight, diameter and length of tomato fruits in a total of three harvests under protected macrotunnel conditions.

Tratamiento	Variables de respuesta		
	Peso (g)	Diámetro (cm)	Longitud (cm)
Genifix	110.62 ± 1.66 <sup>a</sup>	5.19 ± 0.04 <sup>a</sup>	6.83 ± 0.05 <sup>a</sup>
T22	94.96 ± 1.84 <sup>bc</sup>	4.99 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.44 ± 0.06 <sup>b</sup>
Mix	99.27 ± 1.93 <sup>b</sup>	4.96 ± 0.04 <sup>b</sup>	6.55 ± 0.06 <sup>b</sup>
Testigo	92.44 ± 1.60 <sup>c</sup>	4.79 ± 0.05 <sup>c</sup>	6.24 ± 0.05 <sup>c</sup>
C.V. (%)	25.82	12.02	12.75

Literales diferentes indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. Los datos se presentan en  $\bar{X} \pm E.E.$ , C.V. = Coeficiente de Variación, Tukey  $\alpha = 0.05$ .

En relación al peso de muestras de 20 frutos de jitomate (Figura 2), en el primer corte las diferencias significativas ( $F_{3,8} = 32.12, p = 0.0001$ ) mostraron que las muestras de frutos de plantas con Genifix® y T22® tuvieron mayor peso en comparación a las muestras de los frutos testigo y del tratamiento Mix®. En el segundo corte se invirtieron los resultados para los frutos provenientes de las plantas con aplicaciones de T22® y Mix®, ya que muestras de 20 frutos de plantas con Genifix® y Mix® resultaron significativamente ( $F_{3,8} = 23.50, p = 0.0003$ ) más pesadas que las muestras de frutos testigo y del tratamiento con T22®, y para el tercer corte únicamente las muestras de frutos de plantas con Genifix® fueron significativamente ( $F_{3,8} = 9.53, p = 0.0051$ ) más pesadas que las muestras de frutos testigo (Figura 2).

El efecto de los bioestimulantes microbianos evaluados en este trabajo, que en la mayoría de los casos tuvieron resultados superiores al testigo sin aplicación de bioestimulantes, mostraron el potencial de estos para ser utilizados en la promoción del tamaño y peso de frutos de chile morrón y jitomate en condiciones protegidas de macrotúnel, y con esto complementar una fertilización mínima requerida.



**Figura 2.** Efecto de los bioestimulante en el peso de muestras de 20 frutos de jitomate en en tres cortes de frutos en condiciones protegidas de macrotúnel. Literales diferentes indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos, Tukey  $\alpha = 0.05$ .

**Figure 2.** Effect of biostimulants on the samples weight of 20 tomato fruits in three harvests under protected macrotunnel conditions. Different literals indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ) between treatments, Tukey  $\alpha = 0.05$ .

Genifix® es un producto a base de cepas de bacterias *B. megaterium* y *B. subtilis* obtenidas de suelos de sistemas agroforestales (Adame-García *et al.*, 2021), los cuales tienen mayor actividad enzimática y diversidad microbiana en comparación a los suelos de otros cultivos (Paudel *et al.*, 2012). Estas cepas del Genifix® han dado buenos resultados de forma individual en el desarrollo de plántulas con 38.63 cm de longitud y peso de frutos de hasta 6.45 g de chile habanero (Adame-García *et al.*, 2021), ya que estas bacterias se caracterizan por beneficiar a las plantas de forma directa mediante la producción de compuestos fitoestimulantes, o indirecta mediante la síntesis de compuestos con actividad antibiótica que inhiben el crecimiento de fitopatógenos (Rojas-Solís *et al.*, 2013), además de la solubilización de fosfatos y la fijación del nitrógeno (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Los bioestimulantes T22® y Mix® a base de hongos del género *Trichoderma* mostraron también un efecto importante en el desarrollo de frutos más grandes y pesados en relación a los frutos testigo en la mayoría de los cortes y en el total de cortes. Los hongos del género *Trichoderma* incluyen hongos promotores del crecimiento vegetal y agentes de control biológico que se utilizan contra hongos fitopatógenos, también tienen efectos inductores sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, debido a la presencia de hormonas reguladoras de crecimiento que actúan como estimulantes en tejidos meristemáticos primarios en partes jóvenes (Candelero *et al.*, 2015). Se han desarrollado formulaciones comerciales de *Trichoderma* en todo el mundo debido a su alta eficacia, aunque la mayoría se limita a unas pocas especies, incluidas *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. viride* (Fernando *et al.*, 2018).

Con este trabajo se corroboran los efectos positivos de los bioestimulantes a base de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. en frutos de hortalizas, ya que, en su mayoría, la información que se tiene de los efectos de estos microorganismos es sobre la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ejemplo, aislados de *Bacillus* spp. aumentan el área foliar y biomasa seca en plántulas de chile habanero, además de



umentar significativamente la actividad de *B-glucanasas* (Sosa-Pech et al., 2019). En el cultivo de jitomate, cepas de *Bacillus* han mejorado la longitud transversal de la hoja y el diámetro de tallo de la planta, y en el cultivo de zanahoria mejoran la masa fresca de la raíz (Rojas-Badía et al., 2020).

También, *Trichoderma* spp. mejoran la altura, diámetro de tallo, biomasa aérea y volumen de raíz de plantas de chile habanero var. 'Chichén Itzá, así como la formación de hojas, área foliar e índice de clorofila (Larios et al., 2019). Asimismo, tratamientos foliares con *T. harzianum* incrementan el número de hojas, de flores, la altura de planta, el largo y ancho de hojas, la cantidad de folíolos y los rendimientos en el cultivo de jitomate (Pérez et al., 2013). En cuanto a la calidad o dimensiones de frutos, se ha indicado que especies de *Trichoderma* mejoran el peso de frutos en diferentes variedades de chile serrano (Espinoza et al., 2019). Además, cepas de *B. subtilis* han mostrado efectos positivos en el diámetro y firmeza de frutos de jitomate, mejoraron algunos parámetros de la calidad del fruto (Ruiz-Cisneros et al., 2019).

En relación a los bioestimulantes evaluados Genifix®, T22® y Mix®, Murillo et al. (2021) reportan sus efectos en el tamaño y peso de frutos de chile habanero, obteniendo frutos significativamente más grandes y pesados con el uso de estos bioestimulantes; sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, los tratamientos T22® y Mix® tuvieron mejor desempeño en el desarrollo del tamaño del fruto que el producto Genifix®, lo que indica que este producto fue menos eficiente en el cultivo de chile habanero en comparación a los cultivos de jitomate y chile morrón. Estos resultados pueden deberse a una mejor actividad de las cepas de *Bacillus* del producto Genifix® en la inducción de síntesis de hormonas y sistemas de protección en las plantas de jitomate y chile morrón, a diferencia de lo que ocurre en las plantas de chile habanero reportados por Murillo et al. (2021).

Los bioestimulantes T22® y Mix® tuvieron desempeños diferentes en el peso y dimensiones de los frutos, siendo ligeramente superior el bioestimulante T22®, lo cual puede explicarse al ser productos con cepas distintas, lo que permite la posibilidad de que tengan atributos bioquímicos diferentes; por ejemplo, en la producción de auxinas, ácidos orgánicos y solubilización de fosfatos inorgánicos, que permiten que una cepa sea mejor promotora de crecimiento a comparación de otras (Ortuño et al., 2013). Esto debido a que cada cepa y/o especie de *Trichoderma* posee diferentes atributos para la estimulación del crecimiento vegetal y desarrollo de frutos, lo cual se ha confirmado en trabajos como el de Larios et al. (2019), en el cual determinaron la efectividad de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. (SP6 y Clombta) en plantas de *C. chinense* var. "Chichen Itza", encontrando que las plantas tratadas con *Trichoderma* cepa Clombta presentaron mayor crecimiento vegetal y desarrollo de fruto.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos los bioestimulantes evaluados mejoraron del tamaño y peso de frutos de chile morrón y jitomate en plantas con un manejo mínimo

tradicional de fertilización en condiciones de macrotúnel. El producto Genifix® tuvo un mejor desempeño como bioestimulante en el tamaño y peso frutos de chile morrón y jitomate en comparación a los otros productos.

Este trabajo constituye un aporte al conocimiento científico sobre los efectos de bioestimulantes a base de cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* sobre el desarrollo de frutos de jitomate y chile morrón en condiciones protegidas de macrotúnel, con la finalidad de que se consideren como alternativas para mejorar la calidad en el tamaño y peso de frutos en la producción de alimentos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento de los proyectos "Producción de chile serrano, chile morrón y berenjena en condiciones protegidas con enfoque de agricultura sustentable en Úrsulo Galván, Veracruz" clave 14326.22-P y "Alternativa innovadora de producción sustentable de alimentos para escuelas productivas" clave 14151.22-P.

## REFERENCIAS

- Adame-García, J., Murillo-Cuevas, F.D., Flores-de la Rosa, F.R., Velázquez-Mendoza, V., López-Vázquez, M., Cabrera-Mireles, H. y Antonio-Vázquez, E. 2021. Identificación molecular y evaluación de bacterias en el desarrollo vegetativo y producción de chile habanero. *Biotecnia*. 23(3): 151-157.
- Benbi, D.K. 2013. Greenhouse Gas Emissions from Agricultural Soils: Sources and Mitigation Potential. *Journal of Crop Improvement*. 27(6): 752-72.
- Candelero, D.J., Cristóbal, A.J., Reyes, R.A., Tun, S.J.M., Gamboa, A.M.M y Ruíz, S.E. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. *PHYTON*. 84: 113-119.
- Calvo, P., Nelson, L. y Kloepper, J.W. 2014. Agricultural uses of plant bioestimulants. *Plant Soil*. 383: 3-41.
- Chen, L., Vigneault, C., Vijaya, R.G.S. y Kubow, S. 2007. Importance of the phytochemical content of fruits and vegetables to human health. *Stewart Postharvest Review*. 3: 1-5.
- Daverede, I.C., Kravchenko, A.N., Hoeft, R.G., Nafziger, E.D., Bullock, D.G., Warren, J.J. y Gonzini, L.C. 2004. Phosphorus runoff from incorporated and surface-applied liquid swine manure and phosphorus fertilizer. *Journal of Environmental Quality*. 33:1535-1544.
- du-Jardin, P. 2015. Plants bioestimulants: definition, concept, main categories, and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196: 3-14.
- Espinosa-Palomeque, B., Cano-Ríos, P. Salas-Pérez, L., García-Hernández, J.L., Preciado-Rangel, P., Sáenz-Mata, J. y Reyes-Carrillo, J. L. 2019. Bioinoculantes y concentración de la solución nutritiva sobre la producción y calidad de tomate. *Biotecnia*. 21(3): 100-107.
- Espinoza, A.C.A., Gallegos, M.G., Ochoa, F.Y.M., Hernández, C.F.D., Méndez, A.R. y Rodríguez, G.R. 2019. Antagonistas microbianos para biocontrol de la marchitez y su efecto promotor en el rendimiento de chile serrano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, publicación especial*. 23: 187-197.



- Fernando, D., Milagrosa, S., Francisco, C. y Francisco, M. 2018. Biostimulant Activity of *Trichoderma saturnisporum* in Melon (*Cucumis melo*). HORTSCIENCE. 53(6):810-815.
- Gamboa-Angulo, J., Ruíz-Sánchez, E., Alvarado-López, C., Gutiérrez-Miceli, F., Ruíz-Valdiviezo, V.M. y Medina-Dzul, K. 2020. Efecto de biofertilizantes microbianos en las características agronómicas de la planta y calidad del fruto del chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.). Terra Latinoamericana. 38(4): 817-826.
- Hervert-Hernández, D., García, O.P., Rosado, J.L. y Goñi, I. 2011. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. Food Research International. 44: 1182-1189.
- Instituto Nacional de Administración Pública (INAP). 2013. Diagnósticos Municipales PACMA, entidad: Veracruz de Ignacio de la Llave, Municipio: Úrsulo Galván. Instituto Nacional de Administración Pública. México 49p.
- Larios, L.E.J., Valdovinos, N.J. de J.W., Chan, C.W., García, L.F.L., Manzo, S.G. y Buenrostro, N.M.T. 2019. Biocontrol de damping off y promoción del crecimiento vegetativo en plantas de *Capsicum chinense* (Jacq) con *Trichoderma* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 10: 471-483.
- Mendivil-Lugo, C., Nava-Pérez, E., Armenta-Bojórquez, A.D., Ruelas-Ayala R.D., y Félix Herrán, J.A. 2020. Elaboración de un abono orgánico tipo bocashi y su evaluación en la germinación y crecimiento del rábano. Biotecnia. 22(1): 17-23.
- Murillo, R. A. L., Pérez, J. J. R., Cunuhay, K. A. E., Murillo, M. V. L., Quintana, F. V. L., Mero, M. V. C., Coronely, A.L.E., Herrada, M.R., Bravo, D.A.C., Mendoza, A.F.A., y Rodríguez, J.C.G. 2016. Efecto de diferentes abonos orgánicos en la producción de tomate (*Solanum lycopersicum*, L). Biotecnia. 18(3): 33-36.
- Murillo, C.F.D., Cabrera, M.H., Adame, G.J., Vásquez, H.A., Martínez, G.A. de J. y Luria, M.R. 2021. Bioestimulantes en la calidad de frutos de chile habanero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 12(18): 1473-1481.
- Moreno, R.A., Aguilar, D.J. y Luévano, G.A. 2011. Características de la agricultura protegida y su entorno en México. Revista Mexicana de Agronegocios. 15(29): 763-774.
- Noh, M. J., Yam, C.C., Borges, G.L. Zúñiga, A.J.J. y Hernández, G.G. 2014. Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. Terra latinoamericana. 32(4): 273-281.
- Ortuño, N., Miranda, C. y Claros, M. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundario de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. Journal of the Selva Andina Biosphere. 1: 16-32.
- Paudel, B.R., Udawatta, R.P., Kremer, R.J., y Anderson, S.H. 2012. Soil quality indicator responses to row crop, grazed pasture, and agroforestry buffer management. Agroforestry Systems. 84: 311-323.
- Pérez, G.Y., Ayala, S.J.L., Calero, H.A. 2013. Efecto bioestimulante de dos formulados líquidos de *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 en la producción protegida de tomate el cultivo de tomate protegido. Centro Agrícola. 40: 53-56.
- Ramya, V. y Patel, P. 2019. Health benefits of vegetables. International Journal of Chemical Studies. 7: 82-87.
- Reyes-Pérez, J.J., Luna-Murillo, R.A., Zambrano-Burgos, D., Vázquez-Morán, V.F., Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.Á., Guzmán-Acurio, J.A., González-Rodríguez, J.C. y Torres-Rodríguez, J.A. 2018. Efecto de abonos orgánicos en el crecimiento y rendimiento agrícola de la berenjena (*Solanum melongena* L.). Biotecnia. 20(1): 8-12.
- Rojas-Badía, M.M., Bello-González, M.A., Ríos-Rocafull, Y., Lugo-Moya, D. y Rodríguez, S.J. 2020. Utilización de cepas de *Bacillus* como promotores de crecimiento en hortalizas comerciales. Acta Agronomica. 69(1): 54-60.
- Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M. y Santoyo, G. 2013. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. Biológicas. 15(2): 36-41.
- Ruiz-Cisneros, M.F., Ornelas-Paz, J.J., Olivas-Orozco, G.I., Acosta-Muñoz, C.H., Sepúlveda-Ahumada, D.R., Zamudio-Flores, P.B., Berlanga-Reyes, D.I., Salas-Marina, M.A., Cambero-Campos, O.J., Ríos-Velasco, C. 2019. Effect of *Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. Revista Bio Ciencias. 6: 1-17.
- Sánchez L.D.B., Gómez-Vargas, R.M., Garrido, R.M.F. y Bonilla, B.R.R. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3(7): 1401-1415.
- Sánchez, L., Díez, J.A., Vallejo, A. y Cartagena, M.C. 2001. Denitrification losses from irrigated crops in central Spain. Soil Biology & Biochemistry. 33: 1201-1209.
- Sosa-Pech, M., Ruiz-Sánchez, E., Tun-Suárez, J.M., Pinzón-López, L.L. y Reyes-Ramírez, A. 2019. Germinación, crecimiento y producción de glucanasas en *Capsicum chinense* Jacq. inoculadas con *Bacillus* spp. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 6:137-143.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M.M. y Heydrich-Pérez, M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 42(3): 131-138.
- Torres, R.J.A., Reyes, P.J.J. y González, R.J.C. 2016. Efecto de un bioestimulante natural sobre algunos parámetros de calidad en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) bajo condiciones de salinidad. Biotecnia. 18(2): 11-15.
- Velásquez, V.P., Ruíz, E.H., Chaves, J.G. y Luna, C.C. 2014. Productividad de lechuga *Lactuca sativa* en condiciones de macrotúnel en suelo *Vitric haplustands*. Revista de Ciencias Agrícolas. 31(2): 93-105.
- Ye, L., Zhao, X., Bao, E., Li, J., Zou1, Z. y Cao, K. 2020. Bio-organic fertilizer with reduced rates of chemical fertilization improves soil fertility and enhances tomato yield and quality. Scientific Reports. 10:1-11.

## Actividad antioxidante, tóxica y antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis*, *Ruta graveolens* y *Juglans regia* contra *Helicobacter pylori*

Antioxidant, toxic and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Ruta graveolens* and *Juglans regia* against *Helicobacter pylori*

Juanita Deniss Perales-Flores<sup>1\*</sup>, María Julia Verde-Star<sup>1</sup>, José Ezequiel Viveros Valdéz<sup>1</sup>, María Porfiria Barrón-González<sup>1</sup>, Ruth Amelia Garza-Padrón<sup>1</sup>, Víctor E. Aguirre-Arzola<sup>2</sup>, Ramón Gerardo Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Biología Celular y Genética, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 66455.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Laboratorio de Ciencias Naturales, Facultad de Agronomía, Francisco I. Madero S/N, Hacienda el Canadá, Col 17, Cd. Gral. Escobedo, N.L. CP 66050.

### RESUMEN

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, con alta prevalencia a nivel mundial, la infección causa úlceras gástricas, duodenales y cáncer, se considera uno de los principales problemas de salud pública en México. El trabajo evalúa *in vitro* la actividad antioxidante, tóxica, antibacteriana y la capacidad de inhibir la biopelícula formada por *H. pylori* del extracto metanólico *Juglans regia* (EMJR) y los extractos etanólicos crudos de las especies *Rosmarinus officinalis* (EERO) y *Ruta graveolens* (EERG) colectadas en el estado de Nuevo León, México. Mediante tamizaje fitoquímico se determinó cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios. La capacidad antioxidante por el método de DPPH, mostró que el EMJR fue el más activo con una  $CI_{50}$  de 2.759  $\mu\text{g/mL}$ . Los EERG y EERO desarrollaron halos de inhibición de 11 y 16 mm y una CMI de 0.136 y 0.51 mg/mL respectivamente, solo el EERO inhibe la formación de la biopelícula en un 83.7%. Los ensayos de toxicidad sobre *Artemia salina* mostraron toxicidad de débil a moderada. Los resultados demuestran el potencial uso de los extractos estudiados como fuentes alternativas en la búsqueda de nuevos tratamientos contra *H. pylori*.

**Palabras clave:** Romero, Ruda, *Helicobacter pylori*, antibacteriano, citotoxicidad.

### ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a Gram negative bacteria with a high prevalence worldwide, causing gastric and duodenal ulcers and cancer, it is one of the main public health problems in Mexico. This work evaluates the *in vitro* antioxidant, toxic, antibacterial activity, and the ability to inhibit the biofilm formed by *H. pylori*, of the methanolic extract *Juglans regia* (EMJR) and crude ethanolic extracts of the species *Rosmarinus officinalis* (EERO) and *Ruta graveolens* (EERG) collected in the state of Nuevo León, Mexico. Through phytochemical screening, the presence of secondary metabolites was qualitatively determined. The antioxidant capacity by the DPPH method showed that EMJR was the most active with an  $IC_{50}$  of 2.759  $\mu\text{g/mL}$ . The EERG and EERO developed inhibition halos of 11 and 16 mm and a MIC of 0.136 and 0.51 mg/mL respectively, only the EERO inhibits biofilm formation

by 83.7%. Toxicity tests on *Artemia salina* showed weak to moderate toxicity. The results show the potential use of the studied extracts as alternative sources in the search for new treatments against *H. pylori*.

**Keywords:** Rosemary, Ruda, *Helicobacter pylori*, antibacterial, cytotoxicity.

### INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori*, es una bacteria Gram negativa, microaerofílica de forma curva, espiral o fusiforme, con dimensiones de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho, presenta de 4 a 6 flagelos unipolares de 3  $\mu\text{m}$  de largo, de lento crecimiento cuyo reservorio principal es el estómago humano (Palacios *et al.*, 2011). Las infecciones que causa son problema de salud pública (Ayala *et al.*, 2014). Se estima que más del 80% de la población mundial se encuentra afectada por la infección, la cual propicia el desarrollo de úlceras pépticas, gastritis crónica y estrés oxidativo desencadenando inflamación y cáncer de estómago. Dentro de los factores de recurrencia y virulencia desarrollados por la bacteria se ha determinado que la capacidad de formar biopelículas contribuye al desarrollo de infecciones crónicas y resistencia al tratamiento convencional (Hathroubi *et al.*, 2018) el cual consta de una terapia triple en la que se incluyen un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina y claritromicina (World Gastroenterology Organisation (WGO)), recientemente la Organización Mundial de la Salud incluyó en la publicación en su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos a *H. pylori*, situándola en el tercer lugar de la lista de elevada prioridad, debido al desarrollo de resistencia a claritromicina (Salehi *et al.*, 2018). El alto costo del tratamiento convencional aunado a los efectos secundarios y los mecanismos de resistencia generados por la bacteria (World Gastroenterology Organisation (WGO)) hacen que la búsqueda de tratamientos alternativos siga activa. La medicina tradicional es una actividad que ha evolucionado con el paso del tiempo hasta llegar a la medicina actual, en México existe una gran diversidad de plantas que se utilizan en la medicina tradicional como tratamiento para diversas enfermedades, dentro de los que destacan *Ruta graveolens* (Nombre común – Ruda) que tiene la capacidad

de ser un potente antiinflamatorio debido a la presencia de compuestos bioactivos como flavonoides; así mismo es probablemente el remedio más importante en la medicina tradicional para ser utilizado para la inducción del aborto (Colucci-D'Amato y Cimaglia, 2020). *Rosmarinus officinalis* (Romero) es una especie utilizada en la medicina tradicional como antiespasmódico, en cólico renal, tiene actividad antimicrobiana, hepatoprotectiva y anti carcinogénica debido a los compuestos fenólicos presentes tales como ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnósico (Karadağ *et al.*, 2019). Otra especie de gran interés es *Juglans regia* (Nogal), su fruto (la nuez) es reconocido como uno de los más importantes a nivel mundial debido a su alto contenido nutrimental y abundante concentración de compuestos bioactivos como esteroides, fibra dietética y polifenoles que entre otras actividades han demostrado capacidad antibacteriana, antiviral, anticáncer, antiinflamatoria (Zhang *et al.*, 2020). Los extractos de las plantas en estudio pudieran poseer actividad relacionada con la infección causada por *H. pylori*. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los extractos de *Juglans regia*, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens* para conocer su capacidad antibacteriana, anti-biopelícula, antioxidante y tóxica como un paso preliminar para su uso como fuente de nuevos compuestos con propiedades contra *H. pylori*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Las partes aéreas *Ruta graveolens* y *Rosmarinus officinalis* fueron colectadas en Iturbide, Nuevo León, México. Las cáscaras de nuez (*Juglans regia*) fueron donadas por la empresa Alanuez ubicada en Linares Nuevo León, México, como producto de deshecho. Las muestras fueron secadas a 60 °C / 48 h en un horno de secado Yamato DX402C.

### Obtención de los extractos

Los extractos EERG y EERO fueron obtenidos por maceración asistida con ultrasonido (BRANSON 3800) a 40 KHz por 60 min a temperatura ambiente a una relación de 1:12.5 sólido: líquido. Se siguió el mismo procedimiento para las cáscaras de nuez, utilizando metanol, el solvente se eliminó en estufa de secado a 60 °C / 24 h. Finalmente, los extractos se conservaron a 4 °C en viales ámbar hasta su uso.

### Tamizaje fitoquímico de los extractos

Los extractos se sometieron a una serie de pruebas químicas coloridas para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios como: insaturaciones ( $\text{KMnO}_4$ ), carbonilo, grupos aromáticos, oxidrilos fenólicos (taninos vegetales), esteroides y triterpenos, carbohidratos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, alcaloides, flavonoides y saponinas, de acuerdo con Verde-Star *et al.* (2016).

### Actividad antioxidante con DPPH

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó por el método de DPPH la absorbancia se midió a 519 nm

en un espectrofotómetro (Jenway 6320D) (Gutiérrez *et al.*, 2008) utilizando ácido ascórbico como control positivo. Se realizaron diluciones seriadas de los extractos y cada concentración se evaluó por triplicado, se aplicó análisis estadístico Probit para determinar concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ).

### Material biológico

La cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, fue obtenida del laboratorio de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL; y conservada a 4 °C en caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC, de OXOID).

### Efecto bactericida por difusión en disco (Kirby-Bauer)

Para determinar el efecto bactericida se utilizó el método de difusión en disco (Hudzicki, 2009) con algunas modificaciones. El cultivo de *H. pylori* se realizó en caldo ICC, por 18 h / 37 °C posteriormente el inóculo se estandarizó usando el método de suspensión de colonias hasta alcanzar una turbidez comparable con el tubo de 0.5 de la escala de McFarland, para dar una concentración resultante de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, los discos se impregnaron con los extractos a 10 µg/mL utilizando como control negativo etanol y como control positivo gentamicina (cada tratamiento fue realizado por triplicado). Las cajas Petri se incubaron a 40 °C / 24 h. Terminado el periodo de incubación, se midieron y se registraron los halos de inhibición producidos por cada tratamiento.

### Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la CMI se utilizó el método de micro dilución (CLSI, 2008) con algunas modificaciones para el cual se utilizaron placas de 96 pozos con 50 µL de caldo ICC estéril y 50 µL de la solución del extracto (10 µg/mL), se homogeneizaron y realizaron diluciones seriadas, por triplicado, utilizando gentamicina como control positivo (50 µL, 0.3 µg / mL), 50 µL de inóculo como control negativo y 100 µL de caldo ICC como control de crecimiento. La lectura se realizó en un lector de microplacas (EL311, Bio-Tek Instruments) a 570 nm.

### Inhibición de la formación de biopelícula

La inhibición de la formación de la biopelícula se midió utilizando el método de tinción con cristal violeta (Shao *et al.*, 2019) los extractos fueron probados a concentraciones de 0.5, 1 y 3 mg/mL realizando cada tratamiento por triplicado, utilizando gentamicina (0.2 mg/mL) como control positivo y etanol como control negativo.

### Actividad tóxica sobre *Artemia salina*

La toxicidad de todos los extractos fue evaluada utilizando el ensayo de letalidad sobre nauplios de *A. salina* según lo señalado por Meyer y colaboradores (1982); Se realizó un barrido de la actividad de los extractos probando a concentraciones desde 60 hasta 500 ppm, usando como control positivo  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y como control negativo agua de mar, todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las dosis letales medias ( $\text{DL}_{50}$ ) fueron obtenidas utilizando el análisis estadístico Probit.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención y tamizaje fitoquímico de los extractos

El proceso de maceración es una de las técnicas convencionales para la extracción de compuestos bioactivos ampliamente utilizada debido a que es una técnica económica y sencilla (Tambun *et al.*, 2021). El rendimiento más alto se obtuvo de *J. regia* (47.43 %), seguido de *R. graveolens* (3.19 %) y finalmente *R. officinalis* con 0.1 %. (ver Tabla 1). El rendimiento de la extracción es un parámetro que puede verse afectado por factores como: la madurez, temporada de colecta, las características del material vegetal utilizado, técnica y tiempo de extracción, así como el tipo de solvente utilizado, generan diferencias en la efectividad del método de extracción (Adam *et al.*, 2019; Ashraf *et al.*, 2018). El tamizaje fitoquímico es uno de las técnicas más útiles, rápidas y sencillas para la determinación de principios activos relacionados con diversas actividades biológicas y proporciona bases para el aislamiento específico de compuestos de interés (Shaikh y Patil, 2020). Posterior a la obtención, los extractos se sometieron a una serie de pruebas químicas colorimétricas, las cuales, de manera cualitativa, señalan la presencia de diversos grupos funcionales. Esta técnica no es determinante para probar la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios analizados, sino que su utilidad radica en la rapidez con que genera información para la toma de decisiones sobre la efectividad de la extracción, así como sobre las posibilidades de éxito en las actividades a analizar. Los resultados de los extractos en estudio se muestran en la Tabla 2. Los metabolitos encontrados en los extractos concuerdan con lo reportado por Kabubii *et al.* (2015), quien para el tamizaje de *R. officinalis* reporta la presencia de terpenos, taninos, azúcares, saponinas y flavonoides. De los metabolitos comúnmente encontrados en *R. graveolens* según Jinous (2012) se encuentran: cumarinas, alcaloides, terpenoides, flavonoides, saponinas, taninos y glucósidos, los resultados discrepando en su mayoría con lo encontrado en el presente estudio, sólo concuerdan en la presencia de terpenoides y saponinas, la variabilidad en la presencia de los fitoquímicos está relacionada con factores abióticos como la temperatura, salinidad, estacionalidad, ritmo circadiano, altitud, luz, estrés, deficiencia de nutrientes entre otros (Verma and Shukla, 2015). Para el EMJR los metabolitos encontrados concuerdan con lo descrito por Jahanban-Esfahlan y colaboradores (2019) que mencionan que los principales metabolitos de diversas partes de *J. regia* son flavonoides y compuestos fenólicos. La presencia de metabolitos secundarios como flavonoides y

**Tabla 1.** Identificación y rendimiento de extractos.

**Table 1.** Identification and yield of extracts.

Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada	Rendimiento porcentual	Clave del extracto
<i>Ruta graveolens</i>	Ruda	Parte aérea (hoja y tallo)	3.19 %	EERG
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Parte aérea (hoja y tallo)	0.1 %	EERO
<i>Juglans regia</i>	Nogal	Cáscara del fruto (nuez)	47.43 %	EMJR

**Tabla 2.** Evaluación de compuestos fitoquímicos presentes en los extractos evaluados.

(+) Presencia, (-) Ausencia.

**Table 2.** Evaluation of phytochemical compounds present in evaluated extracts.

(+) Presence, (-) Absence.

PRUEBA	EXTRACTO		
	EMJR	EERO	EERG
KMnO4	+	+	+
Carbonilo	+	+	-
Oxidrilos fenólicos	+	+	+
Esteroles y triterpenos (salkowski)	-	+	+
Carbohidratos (molish)	+	+	+
Cumarinas	+	+	-
Lactonas	-	-	-
Flavonoides (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	+	-	-
Sesquiterpenlactonas	+	-	-
Alcaloides dragendorff	-	-	-
Saponinas (bicarbonato de sodio)	-	-	+
Saponinas (salkowski)	+	+	-
Aromaticidad	+	+	+
Flavonoides (shinoda)	+	-	-

chalconas se ha relacionado con la inhibición, interrupción o disminución de factores de virulencia producidos por *H. pylori* (Bonifácio *et al.*, 2014). Así mismo se ha reportado que algunos flavonoides pueden ejercer actividad antimicrobiana directa *in vitro*, también las catequinas, tienen efecto en procesos generales como el daño a la membrana, la motilidad y la adhesión bacteriana (Palacios *et al.*, 2011).

### Actividad antioxidante

Los extractos evaluados mostraron de buena a moderada actividad antioxidante, en la Tabla 3 se enlistan las CI<sub>50</sub> obtenidas por cada especie. El EMJR demostró ser el extracto con mejor actividad, comparada con EERO y EERG, incluso mejor que la del ácido ascórbico utilizado como control en este ensayo, la IC<sub>50</sub> obtenida para este extracto, es similar a la del extracto acuoso de *J. regia* obtenido por Aranda-Ventura José *et al.* (2017), así como comparable con la actividad del antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) reportada por Elansary y colaboradores (2020). Jahanban-Esfahlan y colaboradores (2019) estudiaron el potencial antioxidante de diversas partes de *J. regia* incluyendo cáscaras, reportando menor actividad que la encontrada en este estudio. De acuerdo con de la Cruz-Jiménez y colaboradores (2022), la IC<sub>50</sub> obtenida para EERG muestra que no posee buena actividad en comparación con los extractos en estudio, otros autores reportan para extractos alcohólicos de *R. graveolens*

**Tabla 3.** Concentración media requerida para la inhibición del radical DPPH.

**Table 3.** Average concentration required for the DPPH radical inhibition.

EXTRACTO	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
Ácido ascórbico	3.911
EMJR	2.759
EERO	31.653
EERU	237.843



IC<sub>50</sub> mayores que las encontradas en el estudio (Elansary *et al.*, 2020). Los extractos analizados mostraron actividad dosis dependiente como lo mencionan Oliveira y colaboradores (2008); factores como el tiempo entre recolección y extracción, reacciones entre el solvente de extracción y compuestos fenólicos e incluso factores nutrimentales y ecológicos *in situ* de la planta pueden ser causantes de la poca efectividad como agente antioxidante del extracto (Cao *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2021). Aportar compuestos con actividad antioxidante durante la infección de *H. pylori* es importante debido a que se producen sustancias reactivas al oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) causantes de inflamación y desencadenantes del desarrollo de cáncer gástrico (Butcher *et al.*, 2017), por lo que la destacada actividad mostrada por el EEJR es un indicativo indirecto de su de su efectividad contra *H. pylori*.

### Actividad tóxica

Los resultados mostrados en la Tabla 4 corresponden a la actividad de los extractos en estudio, la clasificación de toxicidad se asigna de acuerdo con lo establecido por Nguta *et al.*, 2011 donde los extractos pueden clasificarse de acuerdo con su DL<sub>50</sub> en: No tóxicos (DL<sub>50</sub> ≥ a 1000 µg/mL), débilmente tóxicos (DL<sub>50</sub> de 500 a 1000 µg/mL), moderadamente tóxicos (DL<sub>50</sub> de 100 a 500 µg/mL) y fuertemente tóxicos (DL<sub>50</sub> ≤ 100 µg/mL). Para extractos hidroalcohólicos de *R. officinalis* se han reportado valores de DL<sub>50</sub> de 470 µg/mL (Kabubii *et al.*, 2015) y 230 µg/mL (Perales Martínez, 2019) clasificándolos como débilmente tóxicos, coincidiendo con lo obtenido para el EERO en estudio. Para el EMJR se encuentra que las DL<sub>50</sub> obtenidas en este estudio son menores a las reportadas por otros autores (Aranda-Ventura José *et al.*, 2017; Martínez-Báez Adbel Z. *et al.*, 2016), quienes reportan DL<sub>50</sub> ≥ 1000 µg/mL, clasificando sus extractos como no tóxico. Referente a las DL<sub>50</sub> del EERG se encuentran reportados resultados muy variados que van desde 5.39 µg/mL (Hamidi *et al.*, 2014) hasta 2,200 µg/mL (Mahboob *et al.*, 2015), las diferencias en las dosis reportadas en los diferentes extractos se relacionan con factores abióticos, métodos y solventes utilizados para la extracción que afectan de forma directa el tipo y cantidad de metabolitos presentes y repercuten de forma directa en la actividad que muestra el extracto.

### Actividad antibacteriana

La prueba de evaluación bactericida de los extractos sobre *H. pylori* utilizando el método de difusión en disco demuestra la bacteria presenta sensibilidad moderada a los extractos EERO y EERG, siendo el EERG el extracto con mejor

**Tabla 4.** Actividad tóxica de los extractos sobre *A. salina* y su clasificación tóxica.

**Table 4.** Toxic activity of extracts on *A. salina* and its toxic classification.

EXTRACTO	DL <sub>50</sub> (µg/mL)	CLASIFICACIÓN
EMJR	307.44	Moderada
EERG	296.105	Moderada
EERO	572.267	Débil
Dicromato	22	Muy tóxico

actividad seguido por el EERO, los resultados de los halos de inhibición se muestran en la Tabla 5. Salehi y colaboradores (2018) reportan para extractos polares de hojas de romero halos de inhibición con valores de 20 mm y CMI de entre 1.25 y 10 mg/mL; para el caso de extractos de ruda reporta zonas de inhibición de 10 mm y CMI de entre 1.25 y 10 mg/mL, Osman y colaboradores (2015) reportan para *R. graveolens* CMI menores a 2 mg/mL, valores similares a los obtenidos en el presente estudio. El porcentaje de inhibición ocasionado por los extractos puede verse limitado por las cuestiones de permeabilidad de la célula a compuestos de carácter polar como los que se encuentran en los extractos etanólicos probados, la naturaleza propia de la bacteria (Gram negativa), lo que limita su pase al interior de la célula y condiciona por lo tanto su actividad (Gutiérrez García, 2015).

**Tabla 5.** Resultados de los halos de inhibición, causadas por los extractos, utilizando el método de difusión en discos. Los resultados mostrados son la media ± la desviación estándar de 3 réplicas.

**Table 5.** Results of the inhibition halos, caused by extracts, using the disk diffusion method. The results showed the average ± standard deviation of 3 replicates.

Actividad antibacteriana de extractos		
Muestra	Actividad	Halo (mm)
EMJR	-	NA
EERG	++	12.7± 0.06
EERO	++	11.20±0
Gentamicina (C+)	++++	35.7± 0.12
Metanol/ Etanol (C-)	-	0

### Actividad sobre la formación de biopelícula

Los extractos que presentaron actividad contra *H. pylori* fueron utilizados para determinar su actividad sobre la formación de biopelícula. Las pruebas realizadas con los EERO y EERG, mostraron que solo el primero posee actividad para inhibir la formación de la biopelícula, Song y colaboradores (2018) reportaron la actividad de *R. officinalis* contra la formación de la biopelícula de bacterias como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* a dosis de 0.1 % v/v, teniendo una inhibición del 50 % de la biopelícula. Los valores porcentuales de inhibición obtenidos en el presente estudio, mostrados en la Tabla 6, son consistentes con los obtenidos por Tran Trung *et al.* (2020) quienes estudiaron el efecto de

**Tabla 6.** Evaluación de la inhibición porcentual de la formación de biopelícula causada por los extractos.

**Table 6.** Evaluation of the inhibition percentage of biofilm caused by the extracts.

Extracto	Concentración del tratamiento	Inhibición porcentual obtenida
EERO	0.5 mg/mL	35.85 %
	1 mg/mL	Sin Actividad
	3 mg/mL	83.79 %
EERU	0.5 mg/mL	
	1 mg/ mL	Sin Actividad
EMJR	3 mg/mL	
	0.5 mg/mL	
	1 mg/mL	Sin Actividad
	3 mg/mL	

la inhibición en la formación de biopelícula por cepas de *H. pylori* ATCC 43504, reportando porcentajes de inhibición del 39.5 % para la mircetina y entre 52.7 y 85.9 % para la naringenina. La diferencia en las concentraciones utilizadas para obtener el efecto inhibitorio similar, se deben a que el extracto probado en el presente estudio es un extracto crudo.

## CONCLUSIÓN

De los extractos en estudio el EERG fue el extracto que mostró mejor actividad antimicrobiana, generando el halo de inhibición más extenso, así como la menor MIC, no mostró capacidad para inhibir la formación de la biopelícula, fue el extracto con menor actividad antioxidante y una actividad tóxica moderada. El EERO fue el único de los extractos que demostró la capacidad para inhibir la formación de la biopelícula, actividad tóxica débil y una mejor actividad antioxidante en comparación con el EERG. El EMJR fue el extracto que mostró la mayor actividad antioxidante entre extractos e incluso mayor que el ácido ascórbico utilizado como control, actividad tóxica moderada y nula actividad antibacteriana y sin capacidad para inhibir el crecimiento de la biopelícula. Los resultados obtenidos demuestran que los extractos analizados manifiestan actividad biológica contra *H. pylori* y podrían ser utilizados como fuente de compuestos en la búsqueda de alternativas para el tratamiento contra esta bacteria.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca escolar No. 514967 para el autor de correspondencia.

## REFERENCIAS

- Adam, O.A.O., Abadi, R.S.M. y Ayoub, S.M.H. 2019. Effect of extraction method and solvents on yield and antioxidant activity of certain sudanese medicinal plant extracts. *The Journal of Phytopharmacology* 8 (5), 248-252. <https://doi.org/10.31254/phyto.2019.8507>.
- Aranda-Ventura, J., Villacrés Vallejo, J., García-de Sotero, D., Sotero Solís, V., Vásquez Torres, D., Monteiro Temmerman, Ú., González-Aspajo, G., Mego Bardales, R. y Vigo Alfaro, W. 2017. Toxicidad, actividad antioxidante in vitro e hipoglicemiantes in vitro e in vivo del extracto acuoso de *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano). *Revista Peruana de Medicina Integrativa* [en línea]. 1(4). <https://doi.org/10.26722/rpmi.2016.14.37>.
- Ashraf, M.A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., y Arif, M.S. 2018. Environmental stress and secondary metabolites in plants: An Overview, in: *Plant metabolites and regulation under environmental stress*. Elsevier, pp. 153-167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X>.
- Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W.I., de La Cruz-Herrera, C.F., y Romero, I. 2014. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology* 20(6), 1450-1469. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1450>.
- Bonifácio, B.V., dos Santos Ramos, M.A., da Silva, P.B., y Bauab, T.M. 2014. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 13(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0054-0>.
- Butcher, L. D., den Hartog, G., Ernst, P. B. y Crowe, S. E. 2017. Oxidative stress resulting from *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3(3), 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.02.002>.
- Cao, Y., Fang, S., Fu, X., Shang, X., y Yang, W. 2019. Seasonal variation in phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. *Forests* 10(8), 624. <https://doi.org/10.3390/f10080624>.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), author Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Eighteenth informational supplement. *M100-S18*. 2008;28(1):34-52.
- Colucci-D'Amato, L., y Cimaglia, G. 2020. *Ruta graveolens* as a potential source of neuroactive compounds to promote and restore neural functions. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 10(3), 309-314. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2020.05.002>.
- De La Cruz-Jiménez, L., Hernández-Torres, M.A., Monroy-García, I.N., Rivas-Morales, C., Verde-Star, M.J., Gonzalez-Villasana, V. y Viveros-Valdez, E. 2022. Biological activities of seven medicinal plants used in Chiapas, Mexico. *Plants*. 11(14), 1790. <https://doi.org/10.3390/plants11141790>.
- Elansary, H.O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., El-Ansary, D.O., Al-Mana, F.A. y Mahmoud, E.A. 2020. Polyphenol content and biological activities of *Ruta graveolens* L. and *Artemisia abrotanum* L. in Northern Saudi Arabia. *Processes*. 8(5), <https://doi.org/10.3390/PR8050531>.
- Gutiérrez Avella M.D., Ortiz García A.C., y Cisneros, A.M. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio Metrología* 2008 1-5.
- Gutiérrez García, G. d. J. 2015. Evaluación de la actividad antimicrobiana de un extracto de tallo de *Yucca baccata* y su uso potencial como conservador en homogenizado de pollo. Tesis maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Disponible en: <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/33/1/Gutiérrez%20García%20Guadalupe%20de%20Jesús.pdf>
- Hathroubi, S., Servetas, S.L., Windham, I., Merrell, D.S., y Ottemann, K.M., 2018. *Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis. *Microbiol Mol Biol*. 82(2), 1-15. [https://doi.org/10.1128/MMBR.82\(2\).1-15](https://doi.org/10.1128/MMBR.82(2).1-15).
- Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*. 1-23.
- Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Tabibiazar, M. y Amarowicz, R. 2019. A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) *Fruit and Tree Molecules*.24(11), 2133. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24112133>.
- Jinous A. 2012. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(23). <https://doi.org/10.5897/jmpr12.040>.

- Kabubii, Z.N., Mbaria, J.M., y Mbaabu, P.M. 2015. Phytochemical composition and Brine Shrimp cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis*. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS) 11, 127-135.
- Karadağ, A.E., Demirci, B., Çaşkurlu, A., Demirci, F., Okur, M.E., Orak, D., Sipahi, H., y Başer, K.H.C. 2019. In vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extract fractions. South African Journal of Botany 125, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.039>.
- Mahboob, A., Ghazala, S., Akram, M. y Ali, S.M. 2015. Investigation of citotoxic activity oh hidroalcoholic extracto of medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). Latin American Applied Research - An international journal [en línea]. 45(4), 231-232.: <https://doi.org/10.52292/j.laar.2015.403>.
- Martínez-Báez A.Z., Oranday-Cárdena A., Verde-Star J., Arévalo-Niño K., Ibarra-Salas M. de J., González-González G.M., y Rodríguez-Garza R.G. 2016. Estudio preliminar sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 47, 36-44.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.A., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., y Mclaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica 45(05), 31-34.: <https://doi.org/https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.
- Nguta, Mbaria, J.M., Gathumbi, J.M., Kabasa, P.K., y Kiama, J.D. 2011. Biological screening of Kenya medicinal plants using artemia salina (ARTEMIIDAE). Pharmacologyonline. 2. 458-478.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., y Pereira, J.A. 2008. Total phenols antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food and Chemical Toxicology 46(7), 2326-2331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.017>
- Osman, S., Jamil, L., y Ramadan, M.A. 2015. Bioactivity Guided Study of Anti-helicobacter Activity of *Ruta graveolens*, Article in International Journal of Applied Research in Natural Products. 8(3), 1-5.
- Palacios Espinosa F., Escobedo Hinojosa W., Romero I. 2011. Panorama actual de estudio de las plantas con actividad anti- *Helicobacter pylori*. TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 14(1), 51-61.
- Perales Martínez, Y. 2019. Evaluación in vitro de antisépticos de origen natural contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Tesis maestría, UANL.
- Hamidi, M.R., Jovanova, B. y Panovska, T.K. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Macedonian Pharmaceutical Bulletin. 60(01), 9-18. <https://doi: 10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>.
- Salehi, B., Id, F.S., Id, M.M., y Rajkovic, J. 2018. Phytochemicals in *Helicobacter pylori* Infections: What Are We Doing Now? International Journal of Molecular Sciences. 19(8), 2361. <https://doi.org/10.3390/ijms19082361>.
- Shaikh, J.R., y Patil, M. 2020. Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. International Journal of Chemical Studies 8(2), 603-608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>
- Shao, X., Xie, Y., Zhang, Y. y Deng, X. 2019. Biofilm Formation Assay in *Pseudomonas syringae*. BIO-PROTOCOL. 9(10). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3237>
- Song, X., Xia, Y., He, Z., y Zhang, H. 2018. A Review of Natural Products with Anti-Biofilm Activity. Current Organic Chemistry 22(8), 789-817. <https://doi.org/10.2174/1385272821666170620110041>
- Srivastava, A.K., Mishra, P., y Mishra, A.K. 2021. Effect of climate change on plant secondary metabolism: An ecological perspective, in: Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules. Elsevier, pp. 47-76. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821710-8.00003-5>
- Tambun, R., Alexander, V., y Ginting, Y. 2021. Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 1122(1), 012095. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1122/1/012095>
- Tran Trung, H., Truong Thi Huynh, H., Nguyen Thi Thuy, L., Nguyen Van Minh, H., Thi Nguyen, M.N., y Luong Thi, M.N. 2020. Growth-inhibiting, bactericidal, antibiofilm, and urease inhibitory activities of *Hibiscus rosa sinensis* L. flower constituents toward antibiotic sensitive- And resistant-strains of *Helicobacter pylori*. ACS Omega 5(32), 20080-20089. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01640>
- Verde-Star, M.J., García-González, S., y Rivas-Morales, C. 2016. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales, in: Investigación En Plantas de Importancia Médica. OmniaScience, pp. 1-40. <https://doi.org/10.3926/oms.315>.
- Verma, N. y Shukla, S. 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2(4), 105-113. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2015.09.002>
- World Gastroenterology Organisation (WGO) [en línea]. (sin fecha). *World Gastroenterology Organisation (WGO)*. [Consultado el 4 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/helicobacter-pylori/helicobacter-pylori-spanish>.
- Zhang, Y.-G., Kan, H., Chen, S.-X., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J.-G., Shang, Y.-F., Wei, Z.-J. 2020. Comparison of phenolic compounds extracted from *Diaphragma juglandis* fructus, walnut pellicle, and flowers of *Juglans regia* using methanol, ultrasonic wave, and enzyme assisted-extraction. Food Chemistry. 321, 126672. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126672>.

# *Trichoderma harzianum* y espinosina en el control de gorgojo del trigo *Sitophilus granarius* (L. 1758)

*Trichoderma harzianum* and spinosyn in the control of wheat weevil *Sitophilus granarius* (L. 1758)

Andrade-Bustamante G.<sup>1</sup>, Angel Manuel Suarez-Hernandez<sup>2</sup>, Emmanuel Aispuro-Hernández<sup>3</sup> y Martínez-Ruiz Francisco E.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Estatal de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, C.P. 83000.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ingeniería y Negocios San Quintin: Ensenada, Baja California, Méx.

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, Méx.

## ABSTRACT

*Sitophilus granarius*, is a small insect which, under favorable conditions, affects up to 85 % of stored wheat. Research efforts are being directed towards the development of bioproducts based on fungi or bacteria with entomopathogenic action, with potential utility as bioinsecticides. Studies related to *Trichoderma harzianum* and spinosyn in the control of the beetle pest of stored grains are minimal and it is in this context, that the objective of this work was to evaluate the effect of *Trichoderma* and spinosyn in the control of *Sitophilus granarius* in stored wheat. For the development of the study, the grain of all treatments was first impregnated with spinosyn; three concentrations (three treatments) of *T. harzianum* conidia were sprayed (T1:10<sup>3</sup>, T2:10<sup>6</sup> y T3:10<sup>9</sup> conidias/mL<sup>-1</sup>), with five repetitions for each treatment. In the study they were considered controls without treatments. The results show that *Trichoderma harzianum* has a bioregulatory effect on *S. granarius*, which is significant when combined with spinosyn. This bioregulatory effect is emphasized when higher concentrations than 10<sup>9</sup> conidia/mL are inoculated. Studies related to coinoculation and the use of spinosyn should be carried out, as well as evaluating the viability of the seed and the organoleptic properties of the grain.

**Keywords:** Insect pests; stored grains; postharvest; bioproducts; biological control.

## RESUMEN

*Sitophilus granarius*, es un pequeño insecto el cual bajo condiciones favorable llega a afectar al trigo almacenado hasta en un 85 %. Los esfuerzos investigativos están siendo orientados hacia el desarrollo de bioproductos a base de hongos o bacterias con acción entomopatógena, con utilidad potencial como bioinsecticidas. Estudios relacionados con *Trichoderma harzianum* y espinosina en el control del coleópteros-plaga de granos almacenados son mínimos y es en este contexto, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de *Trichoderma* y la espinosina en el control de *Sitophilus granarius* en trigo almacenado. Para el desarrollo del estudio, el grano de todos los tratamientos fue impregnado primeramente con espinosina; tres concentraciones (tres tratamientos) de conidias de *T. harzianum*

fueron asperjadas (T1:10<sup>3</sup>, T2:10<sup>6</sup> y T3:10<sup>9</sup> conidias/mL<sup>-1</sup>), con cinco repeticiones cada tratamiento. En el estudio fueron considerados controles sin tratamientos. Los resultados muestran que, *Trichoderma harzianum* presenta un efecto biorregulador sobre *S. granarius*, el cual es significativo cuando se combina con la espinosina. Este efecto biorregulador se enfatiza cuando se inoculan concentraciones superiores de 10<sup>9</sup> conidias/mL. Se deben realizar estudios relacionados con la coinoculación y el uso de la espinosina, asimismo, evaluar la viabilidad de la semilla y propiedades organolépticos del grano.

**Palabras claves:** Plagas insectiles; granos almacenados; postcosecha; bioproductos; control biológico.

## INTRODUCCIÓN

Sonora, un estado ubicado en el noroeste de México, se destaca a nivel mundial por ser un productor y proveedor de granos y forrajes. Con relación a la producción de granos, el estado de Sonora, México resalta a nivel nacional en la producción de trigo, sorgo, maíz, garbanzo, girasol y centeno, principalmente, siguiéndoles en segundo y tercer orden a los estados de Baja California y por Guanajuato, respectivamente. Al mes de septiembre de 2021, Sonora tuvo una superficie sembrada de trigo de 467,319 hectáreas de las cuales se cosecharon 465,997 (99.7 %), con una producción de 2,802,008 toneladas; 16.8 % menos que la obtenida en su homólogo ciclo del año anterior; derivado de una menor superficie sembrada (22 %) (SADER, 2022). En este ciclo en promedio se obtuvo un 95 % de la producción del año agrícola. Sonora con 1.4 millones de toneladas (51.7 % de la producción en el país) junto con Guanajuato, Baja California y Sinaloa, en conjunto aportan el 82.7 % de la producción nacional. La producción obtenida en el ciclo otoño-inverno 2020/21 a nivel nacional, en su mayoría fue del grupo cristalino 56 % y el resto (44 %) fue del tipo panificable (fuerte, medio fuerte, suave y corto, y tenaz). En Sonora el 83 % de la producción de trigo en la entidad es del tipo cristalino y el 17.0 % restante es panificable.

Se puede inferir que la conjunción de las condiciones agroclimáticas y tecnológicas existentes en las regiones donde se siembra trigo en Sonora, son favorables. Sin embargo,

\*Autor para correspondencia: Martínez-Ruiz Francisco E.  
 Correo electrónico: francisco.martinez@ues.mx

Recibido: 1 de agosto de 2022

Aceptado: 18 de septiembre de 2022



hay temporadas y espacios donde las plagas se vuelven un problema y uno de ellos es en el almacenaje ya que, Iturralde (2015), indica que las pérdidas debidas a estos daños oscilan entre un 5 % y un 10 % en países desarrollados y alrededor del 50 % en países en vías de desarrollo, que se traducen en pérdidas económicas que representan unos 300 millones de dólares en países desarrollados. Existen unas 1,000 especies de insectos que infestan los productos almacenados, siendo las de mayor importancia económica las que se encuentran dentro de los órdenes Coleóptera y Lepidóptera (Riudavets *et al.*, 2002). Tradicionalmente, a estas especies se las suele clasificar en plagas primarias o secundarias con base al daño producido sobre el grano (Iturralde, 2015). Las plagas primarias están representadas por insectos altamente especializados con la capacidad de perforar la testa de las semillas (Laskowski *et al.*, 2019). Dentro de este grupo encontramos a coleópteros de las familias Dryophthoridae (*Sitophilus granarius* Linneo = gorgojo de grano =; *Sitophilus oryzae* Linneo = gorgojo del arroz= y *Sitophilus zeamais* Linneo = gorgojo del maíz=), Bostrichidae (*Prostephanus truncatus* Horn = barrenador grande de granos=; *Rhyzopertha dominica* Fabricius = capuchino de los granos=), Bruchidae (*Callosobruchus maculatus* Arora =gorgojo del frijol=) y lepidópteros de la familia Gelechiidae (*Sitotroga cerealella* Olivier = palomilla dorada de los granos, palomita de los cereales=). Las plagas secundarias en cambio son insectos poco especializados que atacan un amplio rango de productos almacenados, procesados y manufacturados. Dentro de éstas se encuentran coleópteros de las familias Cucujidae (*Cryptolestes ferrugineus* Stephens = gorgojo plano = y *Cryptolestes pusillus* Schönherr = gorgojo rojizo de los granos=) Silvanidae (*Oryzaephilus surinamensis* Linneo = carcoma dentada de los granos=) y Tenebrionidae (*Tribolium castaneum* Herbst = gorgojo castaño de la harina = y *Blapstinus interruptum* Solier = escarabajo o gorgojo negro=) (Mebarkia *et al.*, 2010).

*Sitophilus granarius*, catalogado como uno de los escarabajos oscuros, pertenece al orden Coleoptera, es un pequeño insecto perteneciente a la familia Dryophthoridae; esta familia es rica en especies y morfológicamente diversa con aproximadamente 2,300 géneros y 20,000 especies en todo el mundo (Nietupski *et al.*, 2021; Matthews *et al.*, 2010), y muchos más taxones por describir.

*Sitophilus granarius* es un pequeño coleóptero, de mucha movilidad, de aproximadamente 4.5 a 6.5 mm de largo y 2.5 mm de ancho. Los adultos presentan élitros de color marrón negruzco, con diferentes tonos claros u oscuros (Mebarkia *et al.*, 2010). El pronoto está punteado, como los élitros; estos tienen una puntuación localizada en surcos longitudinales. Tiene una tribuna larga, más larga en las hembras que en los machos, y antenas geniculadas rojizas. Las alas traseras están ausentes, por lo que no puede volar. Las patas son de color marrón rojizo. Las larvas tienen una forma típica de "C" de color blanco amarillento, con una cabeza de color marrón oscuro (Fornal *et al.*, 2007).

Para el control de las plagas de los granos almacenados y otros productos agrícolas, la utilización de insecticidas

sintéticos se ha convertido en la herramienta empleada con mayor frecuencia (Acevedo *et al.*, 2018). El uso reiterado de estos ha ocasionado resistencia, eliminación de organismos benéficos, contaminación de agua, suelo y aire (Zehler, 2000), la eficacia de los productos químicos contra las plagas de granos almacenados varía después del tratamiento (Singh y Kaur, 2018). De igual manera, el uso indiscriminado de estos insecticidas sintéticos causa gran riesgo para el medio ambiente y sus residuos pueden afectar a los consumidores. Sobre esta base la necesidad de desarrollar nuevas alternativas que sean seguras y convenientes para el ecosistema, además de eficaces en el control de plagas. En este sentido, los esfuerzos investigativos están siendo orientados hacia el desarrollo de bioproductos a base de hongos o bacterias con acción entomopatógena, con utilidad potencial como bioinsecticidas (Tamez *et al.*, 2001), en particular dada la baja predisposición de este tipo de bioproductos a generar fenómenos de resistencia en los organismos plaga (Anderson, 1998; Porcuna, 2019).

La exploración de los hongos para el control de plagas implica una amplia investigación multidisciplinar: genética, fisiología, ecología, patología, producción masiva, etc. (Vega, 2008). Entre los microorganismos que se destacan en el control de plagas y enfermedades figuran *Trichoderma* spp., *Bacillus thuringiensis* - kurstaki, *Bacillus thuringiensis* - tenebrionis, *Bacillus subtilis*, *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Spinosad*, *Coniothyrium minitans* y Nematodos entomopatógenos, entre otros (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2010). Estas especies han sido investigadas como agentes de control biológico de plagas y enfermedades por cerca de 70 años (Kumar *et al.*, 1996), pero es sólo recientemente que las cepas han comenzado a ser comercialmente aprovechables. Las cepas de *Trichoderma* se les ha denominado Agentes de Control Biológico (ACB), debido a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizosfera, fuerte agresividad contra agentes de enfermedades e insectiles fitopatógenos y eficiencia en promoción de crecimiento de plantas e inducción de mecanismos defensa (Cañedo y Ames *et al.*, 2004). Estas propiedades han hecho, sean entre otras, altamente demandado para ser utilizada en el biocontrol de plagas y enfermedades.

El género *Trichoderma* un ACB, posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por fitopatógenos (Hernández y Orozco, 2019). Estos agentes causantes de enfermedades actúan por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y micoparasitismo, además de producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal (De Oliveira *et al.*, 2014). De igual forma, las especies de *Trichoderma* se caracterizan por tener un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo. Asimismo, pueden producir enzimas extracelulares, antibióticos antifúngicos, ser competidores contra

hongos fitopatógenos y nematodos del género *Meloidogyne* spp. y promover el crecimiento en plantas (Cedeño, 2005; Nenaah *et al.*, 2015; Puertas *et al.*, 2006); con relación a plagas insectiles, específicamente con larvas de *Tenebrio molitor*, estudios demuestran que *Trichoderma harzianum* e investigada para la producción de serina proteasa, quitinasa y actividad antibiótica en relación con la entomopatogenia, la cepa produjo serina proteasa con un kDa; la enzima se produjo durante la fase de crecimiento y presentaba peptidos activos con acción insecticida cuando se alimentaron a las larvas de *Tenebrio molitor* (Shakeri y Howard, 2007).

Otro bioproducto potencial en el control de insectos plaga, destaca la espinosina de origen natural producido por la fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* Mertz (Cisneros *et al.*, 2002). La espinosina es una neurotoxina compuesta por una mezcla de las spinosinas A y D (de ahí spinosAD), las cuales son compuestos tetracíclicos de macrolidos que actúan sobre los receptores post-sinápticos de la acetilcolina nicotínica y los receptores GABA (Ruiz *et al.*, 2008). Su modo de acción no es sistémico, presenta actividad por ingestión y contacto, mientras que su mecanismo de acción es actuar sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina, excitando el sistema nervioso por alteraciones en la función nicotínica y los canales iónicos del GABA (Marina *et al.*, 2014). Los estudios demuestran la capacidad de ser efectivo en el control de lepidópteros (Mendez *et al.*, 2002), dípteros (Bond *et al.*, 2004) y homópteros (Pérez *et al.*, 2007), entre otros.

Estudios relacionados con *Trichoderma* y espinosina en el control del coleópteros- plaga de granos almacenados son mínimos y es en este contexto, que el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de *Trichoderma* y la espinosina en el control de *Sitophilus granarius* en trigo almacenado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa de *Trichoderma harzianum* y la espinosina

Se adquirió una cepa de *Trichoderma harzianum* de la Empresa "Fertilizantes de la Costa Atlántica" en sustrato sólido a base de arroz. Para su posterior propagación, la cepa fue aislada en medio agar papa dextrosa (20 g de dextrosa, 22 g de extracto de papa, 15 g de agar), fue incubada durante siete días a una temperatura de 25 - 28 °C. Siguiendo la técnica de Arévalo *et al.* (2017), se incrementó la producción de conidios a partir de cascarilla de arroz entera + semilla de arroz quebrada (1/4 de tamaño las piezas de arroz) en una proporción de 60 g y 40 g, respectivamente, enriquecida con Carbonato de Calcio al 0,5 mL g<sup>-1</sup> sustrato; el sustrato se depositó en bolsas de plástico de 1 kg. El mismo fue esterilizado en autoclave durante 30 min a 15 psi. En condiciones asépticas se agregó una suspensión de conidios/mL (1 x 10<sup>3</sup>) a los sustratos a razón de 0.04 mL g<sup>-1</sup> de sustrato, una vez inoculado los sustratos se removió las bolsas para lograr una buena homogenización, finalmente se cerró las bolsas para evitar contaminación. La incubación del hongo consistió en ubicar las bolsas en oscuridad a temperatura de 25 °C y hu-

medad relativa del 80 % por 3 d, con la finalidad de propiciar el desarrollo de micelio; transcurrido el tiempo, las bolsas fueron removidas ligeramente con el propósito de brindar oxigenación a los hogos para facilitar el desarrollo (Arévalo *et al.*, 2017). A los siete días de incubación, se abrieron las bolsas para favorecer aireación y deshumedecer el sustrato, generando una mayor esporulación hasta los 14 d. Los últimos cuatro días del proceso de esporulación los sustratos con los hongos, las bolsas se sometieron a temperatura de 16 °C para facilitar la desecación del sustrato. Finalmente, la cosecha de conidios del hongo biocontrolador fue realizada envasando y sellando el producto según Kamaly *et al.* (2016).

La espinosina fue obtenida del producto comercial Spintor 12 Sc (Dow Agro Sciences); Spinosad: (Spinosyn A y Spinosyn D) 11.60 %, equivalente a 120 g de ingrediente activo por litro. Se preparó la espinosina a razón de 0.4 ppm (según EPA/LMRs), colocando 5 mL:L agua<sup>-1</sup>.

### Obtención de *Sitophilus granarius*

Los individuos insectiles de *Sitophilus granarius* procedieron de un asentamiento colonial del laboratorio de la Empresa "Fertilizantes de la Costa Atlántica". Durante seis días para generar una oviposición, los ejemplares progenitores se desarrollaron bajo condiciones controladas de temperatura (29 ± 2 °C), humedad relativa (73 ± 5 %) y fotoperiodo (12 luz: 12 oscuridad), posteriormente fueron eliminados y la nueva generación se mantuvo por 35 d y así generar nueva descendencia de nuevos individuos, los cuales infestaron nuevas muestras de grano estéril y ser utilizados en las pruebas biológicas.

### Biotratamientos de mortalidad de *Sitophilus granarius*

Para el desarrollo del estudio, el grano de todos los tratamientos fue impregnado primeramente con espinosina (15 mL:caja Petri); los 15 mL fueron impregnados al grano apoyándose de una pizeta con punta de spray y después de 180 minutos, tres concentraciones (tres tratamientos) de conidios de *T. harzianum* fueron asperjadas (T1:10<sup>3</sup>, T2:10<sup>6</sup> y T3:10<sup>9</sup> conidios:mL<sup>-1</sup>), con cinco repeticiones cada tratamiento utilizando placas de Petri de 50 mL con diez gramos de trigo e infestándose con 20 ejemplares no sexados de *S. granarius*. Una placa Petri con trigo infestado sin someterse a ningún tratamiento de los bioproductos en estudio, fue empleado como control. Asimismo, otro tratamiento con espinosina sin *T. harzianum* fue considerado. Las cajas Petri con los respectivos tratamientos se sellaron con parafilm para impedir pérdidas y desecación de conidios, volatilización de la espinosina y de organismos insectiles; después se colocaron en una cámara de incubación (MLR-352-PE PHC Europe B.V. / PHCbi) a 29 ± 2 °C y 80 ± 5 % HR. Los tiempos de exposición del insecto a los tratamientos fueron de 72, 144 y 216 h. El experimento se realizó por quintuplicado. Al final de cada tiempo de exposición, los insectos fueron removidos y la tasa de mortalidad fue calculada según la siguiente ecuación de Wong *et al.* (2017) y Abbott (1925):

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{100 (\% \text{ muertos tratados} - \% \text{ muertos control})}{100 - \% \text{ muertos control}}$$

### Análisis estadístico

Un diseño completamente al azar fue desarrollado en el experimento con cinco repeticiones y como fuentes de variación las concentraciones conidiales de *T. harzianum* ( $10^3$ ,  $10^6$  y  $10^9$  conidias/mL<sup>-1</sup>; control sin ACB y control únicamente con espinosina) y, un tiempo de exposición con tres niveles (72, 144 y 216 h). La variable de estudio fue la del porcentaje de mortalidad. Para establecer las diferencias entre los tratamientos y los testigos, se realizaron análisis de varianza con un nivel de significancia  $p = 0.05$  y comparación de medias por Tukey Kramer, mediante el paquete estadístico JMP versión 5.1. Los valores porcentuales fueron transformados al arco-seno $\sqrt{p}$  (Sokal y Rohlf, 1988).

### RESULTADOS Y DISCUSION

Los tratamientos fueron efectivos contra *S. granarius*, con diferencias significativas respecto al control para  $P < 0,005$ . Asimismo, los análisis arrojan que no hubo diferencias significativas de mortalidad al evaluar diferentes concentraciones de conidias de *T. harzianum* (Tabla 1) considerando los distintos tiempos de exposición; sin embargo, numéricamente, se manifiesta que a una concentración de  $10^9$  conidias/mL es superior en comparación de las demás concentraciones al cabo de 216 h. Es importante hacer notar que la inoculación de *T. harzianum* sin la espinosina se comportó numéricamente superior a las 72 h, pero sin diferencias significativas con los tratamientos conidiales a base de *T. harzianum*. A las 144 h, se pudo visualizar que el tratamiento con espinosina + *T. harzianum*, a las 144 h, en concentraciones de  $10^9$  conidias/mL<sup>-1</sup> superó su efectividad en 5 unidades adicionales vs el tratamiento único con *T. harzianum* ( $10^9$  conidias/mL<sup>-1</sup>) sin la adición de espinosina. Un incremento en la mortalidad de *S. granarius* a las 216 h, se ve manifestado (6.2 %), con aquel mismo tratamiento a base de espinosina + *T. harzianum* ( $10^9$  conidias/mL<sup>-1</sup>), en comparación con el de Esp S/T (Tabla 1), y en un 16.5 % con los tratamientos a base de espinosina + *T. harzianum* ( $10^3$  y  $10^6$  conidias/mL<sup>-1</sup>).

**Tabla 1.** Porcentaje de mortalidad de *S. granarius* en trigo expuesto a espinosina y *Trichoderma harzianum*.

conidias/mL <sup>-1</sup>	Trichoderma harzianum		
	72 h	144 h	216 h
$10^3$	65(a)A	73(a)A	82(a)A
$10^6$	68(a)A	75(a)A	85(a)A
$10^9$	68(a)A	82(a)A	97(a)A
Esp S/T	69(a)A	77(a)A	92(a)A
control	0(a)B	0(a)B	0(a)B

Literales minúsculas diferentes en una fila dentro de una misma fuente de conidias son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $P < 0,05$ . Literales mayúsculas diferentes en una columna dentro de una misma fuente de conidias son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $P < 0,05$ . Los valores son el promedio de cinco réplicas. Esp S/T: espinosina sin *T. harzianum*; Control: sin los agentes de control biológico (Espinolina + *T. harzianum*).

Son diversos los resultados que se han obtenido por parte de los ACB. Las observaciones experimentales y de campo, arrojan por ejemplo que *Bacillus thuringiensis*, se caracteriza por formar una espora central o terminal en el esporangio y también por la presencia de un cristal proteico; produce tres exotoxinas: la beta, alfa y gama y una endotoxina llamada delta endotoxina, que es la responsable principal del efecto insecticida; su modo de entrada es las esporas o los cristales de endotoxinas, entran por la boca conforme el insecto se alimenta del follaje, para luego alcanzar el intestino el cual tiene un pH alcalino (Kumar *et al.*, 1996). Otro ACB que figura, es el *Bacillus popilliae*, el cual es causante de la enfermedad lechosa en los escarabajos; las esporas son elípticas o cilíndricas y están ubicadas en la porción central o distal del esporangio; las esporas son ingeridas con suelo y material de las raíces por las larvas mientras se alimentan; en el interior del insecto las esporas germinan y las células vegetativas invaden la hemolinfa; se ha observado que las esporas actúan a nivel de membrana o cutícula, y/o degradando pared celular principalmente en las regiones frágiles de la cutícula de larvas de la familia Scarabaeidae (Coleóptera) y generando una bacteremia (replicación interna de la bacteria). *Beauveria bassiana* por su parte, su micelio es de color blanco y las conidias presentan una coloración blanca a crema. Produce la enfermedad conocida como: Muscardina blanca; el micelio invade los órganos y tejidos, comenzando por el tejido graso generando intranquilidad y pérdida de coordinación del insecto y posteriormente cese de la alimentación, aunado a un cambio en la coloración del tegumento principalmente en escarabajos como *Cosmopolites sordidus*. El ACB, *Trichoderma* spp., se caracteriza por ser saprofito. Es un hongo competitivo, ya que crece muy rápido, y esporula abundantemente. Son antagonísticos: producen antibióticos como gliotoxinas, viridinas y enzimas líticas (Alamri *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan con Mukherjee *et al.* (2012), Kamali *et al.* (2016) y Alamri *et al.* (2016), al indicar que la inoculación de *Trichoderma* con complejos enzimáticos pueden potencializar su efecto biocontrol; fenómeno visualizado en este trabajo. Si bien es cierto, los estudios con *Trichoderma* indican más su efectividad sobre hongos Delgado y Maurcia-Ordoñez (2011) y Vallejos *et al.* (2014), manifiestan sobre su acción bioinsecticida sobre dípteros plaga de cultivos agrícolas. Los mismos autores indican que *Trichoderma* spp., tiene la capacidad de ser utilizado como un ACB vs insectos, debido a su producción de metabolitos secundarios y enzimas (en menor proporción que tales como: proteasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, quitinasas, entre otras (Tronsmo & Harman, 1993; Monzón, 2001), que son los factores clave en el biocontrol. Esta última (quitinasas), se caracterizan por hidrolizar el enlace tres, del polímero N - acetilglucosamina, componente esencial en la estructura de cubierta y membrana de la mayoría de los insectos y microorganismos (Tronsmo y Harman, 1993; Monzón, 2001), lo que da pie al deterioro de la misma y facilita la acción de los demás componentes involucrados en



el biocontrol (metabolitos secundarios). Situación que pudo ocurrir en el presente estudio al observar (entre más tiempo transcurrido y más concentración conidial), como el micelio del hongo se apreciaba sobre la base de las antenas y debajo de los élitros de los insectos en estudio. Adicional a lo anterior, es importante hacer notar que la esporulación de los conidios de *Trichoderma* sobre *S. granarius*, se hizo notar a la acción biocontroladora de la espinosina; éste fenómeno fue más enfático cuando las concentraciones conidiales eran por encima de  $10^6$  condias/mL<sup>-1</sup>. En este sentido, la acción biocontroladora de la espinosina según Infante-Rodríguez *et al.* (2011), Marina *et al.* (2012, 2014, 2018), indican que al ser una neurotoxina compuesta por una mezcla de las spinosinas A y D (de ahí spinosAD), los cuales son compuestos tetracíclicos de macrolidos que actúan sobre los receptores post-sinápticos de la acetilcolina nicotínica y los receptores GABA de los insectos (Marina *et al.*, 2012; 2014; 2018; Pérez *et al.*, 2007), pudo deberse su efecto sinérgico con el de *Trichoderma* spp. (Monzó, 2001; Mukherjee *et al.*, 2012) y que aunque existen estudios donde *Trichoderma* interactúa positivamente con otra clase de organismos benéficos como es el estudio de Martínez *et al.* (2011), que evaluaron la interacción de cuatro especies de micorrizas arbusculares (*Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. claroideum* y *G. constrictum*) y *Trichoderma harzianum* en plantas de melón, con el fin de valorar el crecimiento de las plantas y la incidencia de la marchitez producida por el hongo patógeno, también se han visto efecto positivos en el manejo y control de plagas de almacén (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011).

## CONCLUSIONES

*Trichoderma harzianum* como un Agente de Control Benéfico presenta un efecto biorregulador sobre *S. granarius*, el cual es significativo cuando se combina con la espinosina. Este efecto bioregulator se enfatiza cuando se inoculan concentraciones superiores de  $10^9$  condias/mL. Los autores sugieren, que se deben realizar estudios relacionados con la coinoculación de otros ACB y el uso de la espinosina, asimismo, evaluar la viabilidad de la semilla y propiedades organolépticos del grano.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Ingeniero Martín Arellano Hernández presidente de la Empresa Fertilizantes de la Costa Atlántica, por las facilidades ofrecidas para el desarrollo del presente estudio.

## REFERENCIAS

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Econ. Entom.* 18:265-267. doi: 10.4067/S0718
- Acevedo, M., Zurn, J., Molero, G., y Singh, P. 2018. The role of wheat in global food security. In: Udaya S., editor. *Agricultural Development and Sustainable Intensification: Technology and Policy Challenges in the Face of Climate Change*. Routledge; London, UK. pp. 81-110.
- Alamri, S., Mostafa, Y. S., Hashem, M., y Alrumman, S. 2016. Enhancing the Biocontrol Efficiency of *Trichoderma harzianum* JF419706 through Cell Wall Degrading Enzyme Production. *International Journal of Agriculture and Biology*. 18(4): 765-772.
- Anderson, M. W. 1988. *Biotechnology, alternative agriculture, and public research in Maine*. University of Maine, Ag. Experiment Station, Vol. 1, No. 4.
- Arévalo E., Cayotapa J.C., Olivera D., Gárate M., Trigoso E., Do Bomfim Costa, y León B. 2017. Optimization of substrates for conidia production of *Trichoderma harzianum* by Solid fermentation in the region of San Martin. *Peru. Rev. investig. Altoandin.* 19(2):123-145.
- Bond, J.G., Marina, C.F., y Williams, T. 2004. The naturally-derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Med. Vet. Entom.* 18, 50-56.
- Cisneros, J., Goulson, D., Derwent, L.C., Penagos, D.I., Hernández, O. y Williams, T. 2002. Toxic effects of spinosad on predatory insects. *Biological Control* 23, 156-163.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.
- Cedeño D. Control de *Meloidogyne* spp. en pepino (*Cucumis sativa*) con Micorriza Vesículo Arbuscular (VAM) (Mycoral®), *Trichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*. 2005. [Tesis para optar el Grado Académico de Licenciado]. Honduras: Zamorano; 167 p.
- Delgado, P. A. M., y Murcia-Ordoñez, B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua, Taubaté.* 6(2): 77-90.
- De Oliveira, J., Campos, E., Bakshi, M., Abhilash, P., y Fraceto, L. 2014. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotech. Adv.*32(8):1550-1561. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.010>
- Fornal, J., Jeliński, T., Sadowska, J., Grudas, S., Nawrot, J., Niewiada, A., Warchalewski, J.R., y Błaszczak, W. 2007. Detection of granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) eggs and internal stages in wheat grain using soft X-ray and image analysis. *J. Stored Prod. Res.*43:142-148. doi: 10.1016/j.jspr.2006.02.003.
- Hernández, T. y Orozco, S. 2019. Nanoformulations of botanical insecticides for the control of agricultural pests. *Rev. Fac. Cs' - Univ. Nal. Col.* 9(1)2357-5749. <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v9n1.81401>
- Iturralde Garcia, R.D. Efecto de las atmósferas modificadas sobre el insecto *Callosobruchus maculatus* Fab. En Garbanzo almacenado. Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad de Sonora. 86 p., 2015.
- Infante-Rodríguez, D.A., Novelo-Gutiérrez, R., Mercado, G., y Williams, T. 2011. Spinosad toxicity to *Simulium* spp. larvae and associated aquatic biota in a coffee-growing region of Veracruz State, Mexico. *J. Med. Entom.* 48: 570-576.
- Kamali, N., Sahebani, N., y Pourjam, E. 2016. Effect of *Trichoderma harzianum* BI on chitinase and glucanase activity in tomato roots infected with *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 52(1), 165-187.
- Kumar, P.A., Malik, V.S., y Sharma, R.P. 1996. Insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Applied Microbiology*. 42: 1-43.



- Marina, C.F., Bond, J.G., Muñoz, J., Valle, J., Chirino, N., y Williams, T. 2012. Spinosad: a biorational mosquito larvicide for use in car tires in southern Mexico. *Parasites & Vectors*. 5: 95-112.
- Marina, C.F., Bond, J.G., Muñoz, J., Valle, J., Novelo-Gutiérrez, R., y Williams, T. 2014. Efficacy and non-target impact of spinosad, Bti and temephos larvicides for control of *Anopheles* spp. in an endemic malaria region of southern Mexico. *Parasites & Vectors*. 7: 5-88.
- Marina, C.F., Bond J.G., Muñoz, J. Valle, J., Quiroz-Martínez, H., Torres-Monzón, J.A. y Williams, T. 2018. Efficacy of larvicides for control of dengue, Zika and chikungunya vectors in an urban cemetery in southern Mexico. *Parasit. Res.* 117:1941-1952.
- Martínez, M. A., Roldán, A. y Pascual, J.A. 2011. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: Growth response and Fusarium wilt biocontrol. *App. Soil Ecol.* 47: 98-105.
- Matthews Eg, Lawrence Jf, Bouchard P, Steiner We Jr, Ślipiński Sa. Tenebrionidae Latreille, 1802. In: Leschen RAB, Beutel RG, Lawrence JF. (Eds) *Handbook of Zoology. Volume IV, Arthropoda: Insecta. Part 39, Coleoptera, Beetles. Volume 2: Morphology and Systematics (Elateroidea, Bostrichiformia, Cucujiformia partim)*. Walter de Gruyter, Berlin, 574-659, 2010.
- Mebarkia, A., Rahbe, Y., Guechi, A., y Bouras, A. 2010. Susceptibility of twelve soft wheat varieties (*Triticum aestivum*) to *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) *Agric. Biol. J. N. Am.* 1:571-578.
- Méndez, W.A., Valle, J., Ibarra, J.E., Cisneros, J., Penagos, D.I. y Williams, T. 2002. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control* 25, 195-206.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P., Horwitz, B., Zachow, C., Berg, G. y Zeilinger, S. 2012. *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. *Indian Journal of Microbiology*. 52(4): 522-529.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas CATIE. Turrialba*. 54: 1-12.
- Motta-Delgado, P. A. y Murcia-Ordoñez, B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary J. App. Sc.* 6(2): 1-14.
- Nenaah, G., Ibrahim, S., y Al-Assiuty, B. 2015. Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.). *J. Stored Prod. Res.* 61:9-16. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.12.007>
- Nietupski, M., Ludwiczak, E., Cabaj, R., Purwin, C., y Kordan, B. 2021. Fatty Acids Present in Wheat Kernels Influence the Development of the Grain Weevil (*Sitophilus granarius* L.). *Insects*. 12(9):806-819. doi: 10.3390/insects12090806.
- Laskowski, W., Górska-Warsewicz, H., Rejman, K., Creuzot, M., y Zwolińska, J. 2019. How Important are Cereals and Cereal Products in the Average Polish Diet? *Nutriens*. 11:679. doi: 10.3390/nu11030679.
- Ortiz-Urquiza A., Riveiro-Miranda L., Santiago-Álvarez C., y Quesada-Moraga E. 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol.* 105, 270-278.
- Pérez, C.M., Marina, C.F., Bond, J.G., Rojas, J.C., Valle, J., y Williams, T. 2007. Spinosad, a naturally-derived insecticide, for control of *Aedes aegypti*: efficacy, persistence and oviposition response. *J. Med. Entom.* 44:631- 638.
- Porcuna, C.J. 2019. Control de plagas y enfermedades en agricultura ecológica. *Sociedad Española de Agricultura Ecológica, Madrid España*. 80p.
- Puertas, A., de la Noval, B., Martínez, B., Miranda, I., Fernández, F. y Hidalgo, L. 2006. Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita*. *Rev. Prot. Veg.* 21:80-89.
- Riudavets, J., Lucas, E., y Pons, M. 2002. Insects and Mites of Stored Products in the Northeast of Spain. *International Organization for Biological and Integrated Control /West Palearctic Regional Section*. 25:41-44.
- Ruiz, L., Flores, S., Cancino, J., Arredondo, J., Valle, J., Díaz-Fleischer, F., y Williams, T. 2008. Lethal and sublethal effects of spinosad-based GF-120 bait on the tephritid parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*. 44: 296-304.
- SADER. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Hidráulicos, Pesca y Acuicultura. ¿Sabías que? Sonora es líder en la producción de trigo y grano. 1-4, 2022. <http://oiapes.sagarhpa.sonora.gob.mx/notas/econo/prod-trigo.pdf>
- SADER. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ficha Técnica sobre Actividades Agrícolas, Pecuarias y de Traspasamiento – Almacenamiento y Conservación de Granos y Semillas. 2022. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Publicaciones/Paginas/FichasTecnicas.aspx>. fecha: 20/04/2022.
- Shakeri, J., y Foster H.A. 2007. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enz. Microb. Tech.* 40(4):961-968.
- Singh, B., y Kaur, A. 2018. Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. *LWT—Food Sci. Technol.* 87:93-101. doi: 10.1016/j.lwt.2017.08.077. -
- Sokal, R. y Rohlf, F.J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. (3rd edn). Freeman & Co, San Francisco, CA., 878 p., 1988.
- Tamez, G., Galán, W., Medrano, R., García, G., Rodríguez, P., Gómez, F. y Tamez, G. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*. IV(2):143-152.
- Vega F. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *J Invertebr Pathol.* 98, 277-279.
- Wong-Corral, F., Manríquez, V., Vásquez, V., Buitrón, L., Cabral, T., Barrales, H., Borboa-Flores, J., Cinco-Moroyoqui, F. y Rueda Puente, E. 2017. Aceite de ricinus para el control de *Rhizopryta dominica* en trigo almacenado. *Biocencia XIX*:23-33. <https://biocencia.unison.mx/index.php/biocencia/article/view/411>
- Zehler, J.A. 2000. Chemical Control of Stored Product Insects With Fumigants and Residual Treatments. *Crop Protection*. 19: 577-582.
- Zilkowski, B. y Cossé, A. 2015. A Culture Method for Darkling Beetles, *Blapstinus* spp. (Coleoptera:Tenebrionidae). *J Econ Entomol.* 108(3):1010-1013.

# Efecto de la estacionalidad en la calidad microbiológica y fisicoquímica de leche de cabra producida en el centro de Veracruz, México

Effect of seasonality on the microbiological and physicochemical quality of goat's milk produced at the center of Veracruz, Mexico

**Pablo Díaz-Rivera<sup>1</sup>, Víctor Daniel Cuervo-Osorio<sup>2</sup>, Gregorio Hernández-Salinas<sup>3</sup>, Adán Cabal-Prieto<sup>4</sup>, José Andrés Herrera-Corredor<sup>5</sup>, José Manuel Juárez-Barrientos<sup>6</sup>, Emmanuel de Jesús Ramírez-Rivera<sup>3\*</sup>.**

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Km. 88.5 Carretera Federal Xalapa-Veracruz, vía Paso de Ovejas entre Paso San Juan y Puente Jula, Tepetates, Veracruz, México. C.P. 91690.

<sup>2</sup> Tecnológico Nacional de México/Campus Chiná. Calle 11 S/N entre 22 y 28, Chiná, Campeche, México. C.P. 24520.

<sup>3</sup> Tecnológico Nacional de México/Campus Zongolica. Km 4 Carretera a la Compañía S/N, Tepetitlanapa, Zongolica, Veracruz, México. CP:95005.

<sup>4</sup> Tecnológico Nacional de México/Campus Huatusco. Av. 25 Poniente No. 100, Col. Reserva Territorial, Huatusco, Veracruz, México, C.P. 94100.

<sup>5</sup> Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94946.

<sup>6</sup> Universidad del Papaloapan-Campus Loma Bonita. Av. Ferrocarril S/N, Cd. Universitaria, Loma Bonita, Oaxaca, México. C.P. 68400

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de la estacionalidad en la calidad microbiológica y fisicoquímica de leche de cabra producida en el centro del estado de Veracruz, México. Se evaluaron leches de diferentes unidades de producción caprina (Coatepec, Perote y Tatatila) producidas en las épocas de lluvias, secas y nortes. Se determinaron los contenidos de mesófilos aerobios, coliformes totales *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella ssp* y *Brucella sp.* así como proteína, grasa, lactosa, sólidos no grasos, densidad y acidez. Los resultados microbiológicos determinaron la ausencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Brucella sp* en las leches analizadas. El efecto de la interacción Época del año por Unidad de producción por Tipo de leche mostró que el 50% de las leches (crudas y pasteurizadas) producidas en las épocas de nortes y lluvias presentaron los mayores contenidos de Mesófilos aerobios y Coliformes totales. El efecto de la interacción unidad de producción por tipo de leche presentaron los mayores contenidos de sólidos no grasos, proteínas, lactosa y densidad debido a uso de diferentes forrajes como morera, cascaras de naranja, pasto Taiwán, alfalfa y rastrojo de maíz. Los mayores contenidos de grasa se encontraron en las unidades de producción de Coatepec y Tatatila.

**Palabras claves:** Calidad fisicoquímica, Calidad microbiológica, Épocas estacionales, UPC

## ABSTRACT

The effect of seasonality on the microbiological and physicochemical quality of goat milk produced at the center of the Veracruz state, Mexico, was evaluated. Milk from different goat production units (Coatepec, Perote and Tatatila)

during the rainy, dry and windy seasons were evaluated. The contents of aerobic mesophiles, total coliform *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella ssp.* and *Brucella sp.* as well as protein, fat, lactose, non-fat solids, density and acidity. The microbiological results determined the absence of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* and *Brucella sp.* in the analyzed milks. The effect of the interaction season of the year per production unit per type of milk showed that 50 % of the milk (raw and pasteurized) produced in the windy and rainy seasons presented the highest contents of aerobic mesophiles and total coliforms. The effect of the interaction unit of production by type of milk showed the highest content of non-fat solids, proteins, lactose and density due to the use of different forages such as mulberry, orange peel, Taiwan grass, alfalfa and corn stover. The highest fat contents were found in the production units of Coatepec and Tatatila.

**Keywords:** Physicochemical quality, Microbiological quality, Seasons, GPU.

## INTRODUCCIÓN

La caprinocultura ha demostrado tener un gran valor para el desarrollo económico y social de poblaciones rurales desfavorecidas (Morales-Pablo *et al.*, 2012). A nivel mundial existen más de 909 millones de cabras, siendo China (150 millones), India (154 millones), Pakistán (54 millones) y Sudan (43 millones) quienes tienen el mayor inventario caprino (FAO, 2010; Bidot Fernández, 2017). Solamente el 95 % de la población caprina es usada para la producción de doble propósito (carne-leche), mientras que el resto se adjudica a ella una orientación esencialmente lechera que contribuye con el 27 % de la producción láctea caprina mundial (Bidot

Fernández, 2017). En México, la caprinocultura es una de las actividades primarias de las cuales dependen más de 1.5 millones de personas (Ramírez-Rivera *et al.*, 2017). El inventario caprino supera los 9 millones de cabezas, las cuales están distribuidas en 261,100 unidades de producción (tipo extensivo y semi-extensivo) y su mayor concentración y principal desarrollo se efectúa en lugares marginales de los estados de Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero, Zacatecas, Coahuila y San Luis Potosí (Morales-Pablo *et al.*, 2012; Ramírez-Rivera *et al.*, 2018). En estas unidades caprinas se producen cerca de 1.55 millones de litros de leche de cabra al día, que genera una derrama económica de 2.8 millones de pesos (INEGI, 2007; Salinas-González *et al.*, 2016). Sin embargo, en estas unidades caprinas generalmente no se aplican Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) y esto permite la proliferación exponencial de microorganismos patógenos (i.e. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Brucella melitensis*) que ocasionan Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) como la fiebre de malta, entre otras (Morales-Pablo *et al.*, 2012; Bidot Fernández, 2017). Lo anterior puede comprometer la salud de los consumidores debido a la ingesta de leche de cabra y subproductos no inocuos, lo que conlleva a un impacto negativo en la economía de los productores (Fekadu *et al.*, 2005; Goetsch *et al.*, 2011; Ruiz Romero *et al.*, 2013). Es por ello que, en México se ha desarrollado en materia de políticas públicas, la aprobación de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 (2010) en donde se expresa el uso obligatorio de la pasteurización como un medio de reducción de la carga microbiana en la leche cruda (Gaucher *et al.*, 2008). En este sentido, la leche de cabra se caracteriza por tener proteínas de alta digestibilidad, aminoácidos esenciales (i.e. Treonina, Isoleucina, Leucina, Lisina), mayor contenido de minerales (i.e. Ca, Fe, Mg, P, Na, K y Cu) a comparación de la leche de bovino y elementos funcionales como la Coenzima Q y ácido linolénico conjugado (Villalobos, 2005; Brodziak *et al.*, 2014). Acorde con Salvador y Martínez (2007), el contenido nutrimental de la leche de cabra puede variar por factores intrínsecos como el genotipo, la raza, edad, etapa de lactancia y extrínsecos como el tipo de alimentación y la estacionalidad. Actualmente las investigaciones sobre el efecto de la estacionalidad en la leche de cabra han sido desarrolladas en países como Nigeria, Polonia y Reino Unido (Midau *et al.*, 2010; Brodziak *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). En México, las investigaciones más recientes en leche de cabra no han considerado la estacionalidad y solamente han determinado el contenido nutrimental y microbiológico de este producto (Ramírez-Rivera *et al.*, 2017; Ramírez-Rivera *et al.*, 2018). Es por ello que se considera que las leches producidas en épocas de norte y con un procesamiento térmico contienen un mayor contenido nutrimental y representan un menor riesgo para la salud. La realización de este tipo de investigaciones es necesario para que los productores desarrollen estrategias que minimicen las fluctuaciones microbiológica y fisicoquímica en la leche, ya que este alimento es usado principalmente para la transformación en quesos artesanales (Ramírez-Rivera *et al.*, 2018). Por todo lo anterior,

el objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de la estacionalidad en la calidad microbiológica y fisicoquímica de la leche de cabra producida en unidades caprinas del centro de Veracruz en México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Unidades de producción caprinas

Se consideró una muestra de las Unidades de Producción Caprina (UPC) del Sistema Producto Especie Caprinos de Veracruz, A.C. (SIPECAV). La muestra comprende a cuatro UPC que pertenecen a los municipios de la zona montañosa central y el Altiplano del Estado de Veracruz. Estas UPC son representativas debido a su producción de leche de cabra y elaboración de productos lácteos como quesos artesanales (Ramírez-Rivera *et al.*, 2017). Las razas de cabras predominantes en las UPC son Alpina y Saanen. En la Tabla 1 se muestran las condiciones agroclimáticas, así como el tipo de alimentación usado en estas UPC.

### Muestras de la leche de cabra

En este estudio se consideraron leches producidas en las épocas de lluvias (septiembre, 2014), secas (mayo, 2015) y nortes (noviembre, 2015). En total fueron analizadas  $n = 72$  muestras representativas de 500 mL de leche de cabra, las cuales estuvieron distribuidas de la siguiente manera:  $n = 6$  muestras de leches (tres leches crudas y tres leches pasteurizadas) producidas en  $n = 3$  épocas del año para un total de

**Tabla 1.** Procedencia de las leches y condiciones agroecológicas de las UPC.  
**Table 1.** Milk origin and agroecological conditions of the UPC.

UPC y Municipio	Precipitación promedio anual (mm)	Altitud (msnm)	Temperatura promedio anual (°C)	Tipo de alimentación caprina
Dónelo <sup>1</sup> , Coatepec	1500	1208	18	Morera ( <i>Morus alba</i> ), bagazo de naranja ( <i>Citrus sinensis</i> ), Pasto Taiwan ( <i>Penisetum purpureum</i> ).
Don Luis <sup>2</sup> , Coatepec	1500	1239	18	Diversificado, bejuco ( <i>Cissu verticillata</i> ) y King grass ( <i>Saccharum sinense</i> ).
Hnos. Enríquez <sup>1</sup> , Perote	493.6	2400	12	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y rastrojo de maíz ( <i>Zae mays</i> ).
Rincón del Río Frio, Tatatila <sup>2</sup>	1346	1867	20	Bellotas ( <i>Quercus ilex</i> ), pastos Kikuyo ( <i>Pennisetum clandestinum</i> ) y Lolio ( <i>Lolium multiflorum</i> )

<sup>1</sup>: Sistema Intensivo con alimentación específica y cabras estabuladas.

<sup>2</sup>: Sistema semi-intensivo (con alimentación diversificada y cabras en pastoreo).



18 muestras por UPC. La leche cruda fue recolectada directamente del tanque de recolección posterior a la ordeña y la leche pasteurizada fue tomada inmediatamente al concluir el tratamiento térmico (63 °C por 30 min). Las muestras fueron transportadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana (NOM-109-SSA1-1994) para su inmediato análisis microbiológico y fisicoquímico.

### Análisis microbiológico de la leche

Se determinaron por triplicado los siguientes parámetros microbiológicos de acuerdo con los métodos de la Official Methods of Analysis (AOAC, 2005): Mesófilos Aerobios (MA) (método 966.23), Coliformes Totales (CT) y *Escherichia coli* (*E. coli*) (método 991.14) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (método 2003.08). Las determinaciones de *Salmonella spp.* (*S. spp.*) y *Brucella melitensis* se realizaron de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas NOM-114-SSA1-1994 y NOM-041-ZOO-1995, respectivamente. Los resultados microbiológicos se expresaron en  $\log_{10}$  (Ramírez-Rivera *et al.*, 2018).

### Análisis fisicoquímico de la leche

En todas las muestras se determinaron por triplicado los contenidos ( $\text{g L}^{-1}$ ) grasa, Sólidos No Grasos, Proteína, Lactosa y Densidad ( $\text{kg m}^{-3}$ ) mediante un analizador por ultrasonido Lactoscan S (Milkotronic Ltd., Nova Zagora, Bulgaria). La determinación de la acidez titulable ( $\text{g L}^{-1}$  de ácido láctico) o Acidez (ACI) se efectuó acorde al método 947.05 (AOAC, 2005) en el cual se adicionó 1 mL de la solución (0.5 % p/p) de fenolftaleína en 10 mL de leche de cabra y posteriormente la mezcla fenolftaleína-leche de cabra fue titulada con NaOH (0.11 N) hasta que la muestra alcanzó una tonalidad rosa consistente por 5 s.

### Análisis estadístico

Los datos microbiológicos y fisicoquímicos fueron colectados en matrices de datos con dimensiones  $J \times K$ , donde  $J = 72$  muestras de leches y  $K = 6$  variables microbiológicas (o 6 variables fisicoquímicas) para un total de 432 datos microbiológicos y 432 datos fisicoquímicos. Se calculó el promedio y la desviación estándar de los datos microbiológicos y fisicoquímicos. Se aplicó un Análisis de Varianza de Modelos Lineales Generalizados (GLM) y la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad del 5%.

El modelo estadístico aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + EP_i + UP_j + TL_k + EP^*UP_{ij} + UP^*TL_{jk} + EP^*TL_{jk} + E_{ijkl}$$

Dónde:  $Y_{ijkl}$  = variable de respuesta;  $\mu$  efecto común,  $EP_i$  efecto de la  $i$ -ésima época;  $UP_j$  = efecto de la  $j$ -ésima  $UP$ ;  $TL_k$  = efecto del  $k$ -ésimo tipo de leche;  $EP^*UP_{ij}$  = interacción de la época x  $UP$ ;  $UP^*TL_{jk}$  = interacción de la  $UP$  x tipo de leche;  $EP^*TL_{jk}$  = interacción época x tipo de leche;  $E_{ijkl}$  = Error aleatorio con media 0 y varianza del error  $\sigma_e^2$ . También se calcularon los coeficientes de determinación  $R^2$  de cada modelo. Para el tratamiento estadístico de los datos se usó el procedimiento de GLM del programa estadístico SAS® versión 9.4 (Statistical Analysis Systems Institute Inc, U.S.A).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de efectos en el contenido microbiológico de la leche

En la Tabla 2 se muestran los resultados de los efectos considerados en esta investigación. Se observa que todos los efectos evaluados fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.01$ ) para las variables microbiológicas MA y CT. Cabe mencionar que hubo ausencia de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella ssp.* y *B. melitensis* en todas las leches evaluadas. Este resultado confirma la aplicación de buenas prácticas de ordeña usadas en las diferentes UPC. Por lo tanto, la Época del año (EP) incide significativamente ( $p < 0.01$ ) en el contenido de MA y CT, esto concuerda con Tormo *et al.* (2011), quienes demostraron que las condiciones de producción y la época tiene un efecto importante en el perfil microbiológico de la leche de cabra. En donde, el contenido de MA de las leches producidas en las épocas lluvias, nortes y secas fueron 2.81, 3.61 y 3.22 Log UFC  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Para el caso de CT, los valores encontrados fueron de 1.17, 2.52 y 1.96 Log UFC  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente (Tabla 3). Estos resultados son diferentes a los presentados por Tormo *et al.* (2011) quienes obtuvieron valores de MA y CT de 0.23 y 1.17 Log UFC  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente en leches de cabra producidas en UP de Francia durante el mes de febrero. Esta diferencia puede deberse a las condiciones de producción y temperaturas que influyen en la multiplicación microbiana. Respecto al efecto de UP, se encontró que las leches producidas en las UP Luis y Hnos. Enríquez presentaron el mayor conteo microbiano de MA de 3.2 y 3.73 Log UFC  $\text{mL}^{-1}$  a comparación de las leches de las UP Donelo y RRF quienes tuvieron conteos de MA  $< 3$  Log UFC  $\text{mL}^{-1}$  (Tabla 3). Los resultados del efecto Tipo de leche (TL) (Tabla 3) indicaron que la pasteurización contribuyó a la reducción de la carga microbiana de MA (4.00 a 2.43 Log UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) y CT (2.52 a 1.25 Log UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). Sin embargo, con la interacción Época del año por Tipo de leche ( $EP^*TL$ ) se encontró la mayor incidencia microbiológica de MA en leches

**Tabla 2.** Análisis de varianza de las variables microbiológicas.

**Table 2.** Analysis of variance of the microbiological variables.

FV <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	CM <sub>MA</sub> <sup>3</sup>	CM <sub>CT</sub> <sup>4</sup>
Modelo	23	6.07**	10.56**
Error	48	0.005	0.002
EP	2	3.82**	10.97**
UPC	3	15.90**	15.92**
EP*UPC	1	3.52**	4.39**
TL	6	44.46**	29.42**
EP*TL	2	1.12**	38.89**
UPC*TL	3	3.49**	9.54**
EP*UPC*TL	6	1.005**	1.83**
R <sup>2</sup>		0.99	0.99

<sup>1</sup>: FV: Fuente de Variación. <sup>2</sup>: GL: Grados de libertad. <sup>3</sup>:  $CM_{MA}$ : Cuadrado medio de la variable Mesófilos aerobios. <sup>4</sup>:  $CM_{CT}$ : Cuadrado medio de la variable Coliformes totales. EP: Época. UPC: unidad de producción caprina.  $EP^*UPC$ : Interacción época x unidad de producción. TL: Tipo de leche.  $EP^*TL$ : Interacción época x Tipo de leche.  $UPC^*TL$ : Interacción Unidad de producción x Tipo de leche.  $EP^*UPC^*TL$ : Interacción Época x Unidad de producción x Tipo de leche.  $R^2$ : Coeficiente de determinación del modelo. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ . ns: No significativo.



**Tabla 3.** Efectos EP, UP, TL e interacción EP\*TL en aspectos microbiológicos de la leche de cabra de la zona montañosa central del estado de Veracruz.  
**Table 3.** EP, UP, TL effects and EP\*TL interaction in microbiological aspects of goat's milk from the central mountainous area of the state of Veracruz.

¹Efecto EP	MA	CT
	Log UFC mL <sup>-1</sup>	Log UFC mL <sup>-1</sup>
Lluvias	2.81 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.01 <sup>a</sup>
Nortes	3.61 ± 0.01 <sup>b</sup>	2.52 ± 0.01 <sup>b</sup>
Secas	3.22 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.96 ± 0.01 <sup>c</sup>
¹Efecto UP		
Rincón del Río Frío <sup>1</sup>	2.23 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.01 <sup>a</sup>
Donelo <sup>2</sup>	2.64 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.01 <sup>b</sup>
Enríquez <sup>3</sup>	3.73 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.27 ± 0.01 <sup>c</sup>
Luis <sup>4</sup>	3.2 ± 0.01 <sup>d</sup>	3.04 ± 0.01 <sup>d</sup>
¹Efecto TL		
Cruda	4 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.52 ± 0.008 <sup>a</sup>
Pasteurizada	2.43 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.008 <sup>b</sup>
²Interacción EP*TL		
Lluvias-Cruda	3.85 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.357 ± 0.01 <sup>a</sup>
Lluvia-Pasteurizada	1.78 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.99 ± 0.01 <sup>b</sup>
Nortes-Cruda	4.24 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.04 ± 0.01 <sup>a</sup>
Nortes-Pasteurizada	2.99 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.01 <sup>b</sup>
Secas-Cruda	3.92 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.18 ± 0.01 <sup>a</sup>
Secas-Pasteurizada	2.52 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.01 <sup>b</sup>

EP: Época. UPC: unidad de producción caprina. TL: Tipo de leche. EP\*TL: Interacción época x Tipo de leche. <sup>1</sup>Literales diferentes en columna indican diferencias significativas. <sup>2</sup>Literales diferentes en columna por época y tipo de leche indican diferencias significativas.

crudas en las épocas de nortes (4.24 Log UFC mL<sup>-1</sup>) y secas (3.92 Log UFC mL<sup>-1</sup>). Aunque, posterior a la pasteurización esta carga de MA mostro una reducción de 2.52 y 2.99 Log UFC mL<sup>-1</sup> para las mismas épocas. Las cargas de MA en las leches pasteurizadas están por debajo del límite 4.47 Log UFC mL<sup>-1</sup> establecido por la (NOM-091-SSA1-1994). La reducción de MA demuestra el efecto positivo del tratamiento térmico de la leche usado en las diferentes UP consideradas en esta investigación (Kousta *et al.*, 2010). Las cargas más altas de CT en leches crudas fueron 4.04 y 3.18 Log UFC mL<sup>-1</sup> (épocas de nortes y secas, respectivamente), este resultado se redujo a valores de 1.00 y 0.74 Log UFC mL<sup>-1</sup> para las mismas épocas. Las cargas microbianas de CT posteriores a la pasteurización se encuentran en el límite máximo (1.00 Log UFC mL<sup>-1</sup>) establecido en la (NOM-243-SSA1-2010). Sin embargo, en la época de lluvias se encontró que la leche cruda presentó menor carga de CT (0.35 Log UFC mL<sup>-1</sup>) respecto a la leche pasteurizada (1.99 Log UFC mL<sup>-1</sup>). Esto pudo deberse a una posible contaminación post-pasteurización ocasionado por la falta de limpieza y desinfección en equipos, utensilios y por los posibles tiempos prolongados (superiores a 48 h) de almacenamiento a temperatura ambiente (Yamazi *et al.*, 2013). Los resultados de la interacción Época del año por Unidad de producción por Tipo de leche (EP\*UPC\*TL) mostró que las leches sin procesamiento térmico de las UP Luis y Hnos. Enríquez producidas en la época de nortes (4.18 y 4.50 Log UFC mL<sup>-1</sup>) y lluvias (5.16 y 4.12 Log UFC mL<sup>-1</sup>) presentaron el mayor contenido de MA. Para CT el mayor conteo se presen-

tó en la época de nortes y en las leches crudas producidas en las UP de Luis (4.10 Log UFC mL<sup>-1</sup>) y Hnos. Enríquez (4.27 Log UFC mL<sup>-1</sup>) (Tabla 4). Los resultados mostrados coinciden con los reportados por Delgado-Pertiñez *et al.* (2003) quienes observaron la mayor incidencia de bacterias MA y CT en los meses de diciembre, enero y febrero (4.94, 5.09 y 4.92 Log UFC mL<sup>-1</sup>) pertenecientes a la época de nortes.

**Tabla 4.** Efectos de la interacción EP\*UP\*TL en aspectos microbiológicos de la leche de cabra de la zona montañosa central del estado de Veracruz.  
**Table 4.** EP\*UP\*TL interaction effects on microbiological aspects of goat's milk from the central mountainous area of the state of Veracruz.

EP*UP*TL	MA	CT
	Log UFC mL <sup>-1</sup>	Log UFC mL <sup>-1</sup>
Lluvias-Donelo-LC	2.70 ± 0.044 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
Lluvias-Donelo-LP	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
Lluvias-Enríquez-LC	4.12 ± 0.044 <sup>a</sup>	1.428 ± 0.03 <sup>a</sup>
Lluvias-Enríquez-LP	3.54 ± 0.044 <sup>b</sup>	4.63 ± 0.03 <sup>b</sup>
Lluvias-Luis-LC	5.16 ± 0.044 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
Lluvias-Luis-LP	3.6 ± 0.044 <sup>b</sup>	3.36 ± 0.03 <sup>b</sup>
Lluvias-Rincón del Río Frío-LC	3.41 ± 0.044 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
Lluvias-Rincón del Río Frío-LP	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
Nortes-Donelo-LC	4.16 ± 0.044 <sup>a</sup>	3.73 ± 0.03 <sup>a</sup>
Nortes-Donelo-LP	2.49 ± 0.044 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
Nortes-Enríquez-LC	4.50 ± 0.044 <sup>a</sup>	4.27 ± 0.03 <sup>a</sup>
Nortes-Enríquez-LP	2.67 ± 0.044 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
Nortes-Luis-LC	4.18 ± 0.044 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.03 <sup>a</sup>
Nortes-Luis-LP	4.03 ± 0.044 <sup>b</sup>	4.01 ± 0.03 <sup>a</sup>
Nortes-Rincón del Río Frío-LC	4.12 ± 0.044 <sup>a</sup>	4.01 ± 0.03 <sup>a</sup>
Nortes-Rincón del Río Frío-LP	2.76 ± 0.044 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
Secas-Donelo-LC	3.97 ± 0.044 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.03 <sup>a</sup>
Secas-Donelo-LP	2.54 ± 0.044 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
Secas-Enríquez-LC	4.10 ± 0.044 <sup>a</sup>	3.31 ± 0.03 <sup>a</sup>
Secas-Enríquez-LP	3.44 ± 0.044 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
Secas-Luis-LC	4.49 ± 0.044 <sup>a</sup>	3.76 ± 0.03 <sup>a</sup>
Secas-Luis-LP	4.11 ± 0.044 <sup>b</sup>	2.99 ± 0.03 <sup>b</sup>
Secas-Rincón del Río Frío-LC	3.11 ± 0.044 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.03 <sup>a</sup>
Secas-Rincón del Río Frío-LP	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>

EP\*UPC\*TL: Interacción Época x Unidad de producción x Tipo de leche. LC: Leche cruda. LP: Leche pasteurizada (63 °C por 30 min). Literales diferentes en columna indican diferencias significativas.

### Análisis de efectos en el contenido fisicoquímico de la leche

Los efectos analizados para cada variable fisicoquímica se muestran en la Tabla 5. Se observa que todos los efectos e interacciones fueron significativo con excepción de la interacción EP\*TL. Los valores de R<sup>2</sup> (0.76 - 0.96) demuestran el alto nivel de explicación del modelo aplicado. Analizando la significancia de cada efecto por variable se encontró que para el contenido de Grasa todos los efectos fueron significativos (p < 0.05) con excepción de las interacciones EP\*TL y UPC\*TL. En el caso de Sólidos No Grasos solamente el efecto la interacción EP\*TL no tuvo efecto significativo (p

**Tabla 5.** Análisis de varianza de la composición de la leche de cabra para los efectos incluidos en el modelo utilizado.  
**Table 5.** Goat's milk composition analysis of variance for the effects included in the model used.

F.V.	G.L.	CM <sub>GRA</sub>	CM <sub>SNG</sub>	CM <sub>PRO</sub>	CM <sub>LAC</sub>	CM <sub>DEN</sub>	CM <sub>ACI</sub>
Modelo	17	152.8**	250.6**	35.7**	72.1**	34.7**	59.3**
Error	54	13.0	4.2	0.4	1.6	0.4	3.3
EP	2	109.4**	70.8**	3.5*	32.8**	3.0**	188.3**
UPC	3	524.3**	239.9**	56.4**	43.7**	57.0**	33.6**
EP*UPC	6	108.2**	525.7**	66.4**	158.9**	63.8**	83.1**
TL	1	113.3**	18.4*	0.8 <sup>NS</sup>	9.1*	0.81 <sup>NS</sup>	1.1 <sup>NS</sup>
EP*TL	2	16.5 <sup>NS</sup>	3.0 <sup>NS</sup>	0.6 <sup>NS</sup>	0.9 <sup>NS</sup>	0.50 <sup>NS</sup>	3.7 <sup>NS</sup>
UPC*TL	3	3.3 <sup>NS</sup>	73.6**	10.0**	21.5**	9.6**	7.6 <sup>NS</sup>
R <sup>2</sup>		0.79	0.94	0.96	0.93	0.96	0.85

<sup>1</sup>: FV: Fuente de Variación. <sup>2</sup>: GL: Grados de libertad. <sup>3</sup>: CM<sub>GRA</sub>: Cuadrado medio de la variable Grasa. <sup>4</sup>: CM<sub>DEN</sub>: Cuadrado medio de la variable Densidad. <sup>5</sup>: CM<sub>SNG</sub>: Cuadrado medio de la variable Sólidos No Grasos. <sup>6</sup>: CM<sub>PRO</sub>: Cuadrado medio de la variable proteína. <sup>7</sup>: CM<sub>LAC</sub>: Cuadrado medio de la variable lactosa. <sup>8</sup>: CM<sub>ACI</sub>: Cuadrado medio de la variable acidez. EP: Época. UPC: unidad de producción caprina. EP\*UPC: Interacción época x unidad de producción. TL: Tipo de leche. EP\*TL: Interacción época x Tipo de leche. UPC\*TL: Interacción Unidad de producción x Tipo de leche. R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación del modelo. \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01. NS: No significativo.

> 0.05). Para el contenido de Proteína se observó diferencias significativas en todos los efectos con excepción de las interacciones TL y EP\*TL. En el caso del contenido de Lactosa solamente la interacción EP\*TL no se encontraron diferencias significativas. Para la Densidad todos los efectos fueron significativos con excepción de TL y EP\*TL. Para el contenido de Acidez se observaron que los efectos TL, EP\*TL y UPC\*TL no fueron significativos. Para el efecto EP los mayores contenidos de Grasa y Sólidos No Grasos se obtuvieron en las épocas de nortes (50.03 g L<sup>-1</sup>) y lluvias (70.16 g L<sup>-1</sup>) (Tabla 6). De acuerdo con Todaro *et al.* (2005), la leche con contenidos altos de grasa puede deberse al consumo de pasturas ricas en proteínas generadas en esas épocas. Los mayores contenidos de Proteína (23.91 y 23.41 g L<sup>-1</sup>) y Lactosa (42.08 y 40.09 g L<sup>-1</sup>) se mostraron en las épocas de nortes y secas (Tabla 6). Lo anterior puede deberse a que las cabras muestran su mayor desempeño productivo en las épocas antes mencionadas (Midau *et al.*, 2010). Sin embargo, Fekadu *et al.* (2005) observaron que los mayores contenidos de proteína de las leches de Estados Unidos se producen en los meses de septiembre a

octubre. Por su parte, Mayer y Fiechter (2011) mostraron que los contenidos altos de Grasa, Sólidos No Grasos, Proteína y Lactosa de leches producida en Austria se han obtenido en las épocas de nortes y lluvias. Aunque la diferencia de la composición nutrimental de la leche caprina producida entre las épocas también puede atribuirse a la calidad de la pastura y al consumo energético de las cabras para su locomoción en búsqueda de forraje (Steinshamn *et al.*, 2014). Sin embargo, se observó la existencia de una relación inversa entre las variables Grasa y Lactosa, este mismo efecto fue observado por Grimley *et al.* (2009) en leches producidas en los meses de primavera (marzo a junio). En el caso de la Densidad se encontraron diferencias (p < 0.05) entre las épocas evaluadas y siendo la época de norte donde se encontró una mayor densidad en la leche. Los valores de Densidad encontrados en esta investigación son consistentes con los reportados por Iancu (2010) y Chen *et al.* (2014) quienes evaluaron leches de cabra de Rumania y Noruega y reportaron rangos de densidad de 1029 – 1033 y 1028 kgm<sup>-3</sup>, respectivamente. El mayor contenido de Acidez se obtuvo en las épocas de lluvias y nortes (22.49 y 20.77 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico, respectivamente), este resultado pudo estar asociado con el incremento de la carga microbiana generado en dichas épocas. El análisis del efecto UPC demostró que los contenidos mayores de Grasa se obtuvieron en las UPC Rincón del Rio Frio y Donelo (54.54 y 50.04 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) a comparación de las UPC Luis y Hnos. Enríquez (44.02 y 43.04 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) (Tabla 7). Las diferencias en los contenidos de Grasa entre UPC están en función del tipo de alimentación caprina. De acuerdo con Todaro *et al.* (2005), Brodziak *et al.* (2014), Park *et al.* (2007), Salvador *et al.* (2014), la alimentación diversificada contribuye a un menor balance energético del animal provocando una mayor movilización de la grasa corporal para la síntesis de la grasa de la leche. Por su parte, Morand-Fehr *et al.* (2007) mencionaron que los altos contenidos de grasa en las leches pueden darse cuando hay una mayor proporción de forraje natural en la dieta caprina. Los contenidos mayores de Sólidos No Grasos, Proteína y Lactosa se obtuvieron en las leches de las UP Donelo (73.21, 24.17 y 41.76 g L<sup>-1</sup>, respectivamente),

**Tabla 6.** Composición de la leche de cabra por época del año de la zona montañosa central del estado de Veracruz.

**Table 6.** Goat's milk composition by time of year at Veracruz state central mountainous area.

Variable	Épocas del año		
	Lluvias <sup>1</sup>	Nortes <sup>2</sup>	Secas <sup>3</sup>
Grasa (g L <sup>-1</sup> )	47.94 ± 0.74 <sup>ab</sup>	50.03 ± 0.74 <sup>a</sup>	45.76 ± 0.74 <sup>b</sup>
Sólidos no grasos (g L <sup>-1</sup> )	70.16 ± 0.42 <sup>b</sup>	73.29 ± 0.42 <sup>a</sup>	70.49 ± 0.42 <sup>b</sup>
Proteína (g L <sup>-1</sup> )	23.16 ± 0.14 <sup>b</sup>	23.91 ± 0.14 <sup>a</sup>	23.41 ± 0.14 <sup>a</sup>
Lactosa (g L <sup>-1</sup> )	40.02 ± 0.26 <sup>b</sup>	42.08 ± 0.26 <sup>a</sup>	40.09 ± 0.26 <sup>b</sup>
Densidad (kg m <sup>-3</sup> )	1022.6 ± 0.13 <sup>b</sup>	1023.3 ± 0.13 <sup>a</sup>	1022.8 ± 0.13 <sup>ab</sup>
Acidez (g L <sup>-1</sup> de ácido láctico)	22.49 ± 0.37 <sup>a</sup>	20.77 ± 0.37 <sup>b</sup>	17.02 ± 0.37 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Época de Lluvias (septiembre del 2014). <sup>2</sup> Época de nortes (noviembre del 2015). <sup>3</sup> Época de secas (mayo del 2015). Literales diferentes en fila indican diferencias significativas.

**Tabla 7.** Composición de la leche de cabra por unidad de producción caprina en la zona montañosa central de Veracruz.**Table 7.** Goat milk composition per goat production unit at Veracruz central mountainous area.

Variable	Unidad de Producción Caprina			
	Rincón del Río Frío <sup>1</sup>	Donelo <sup>2</sup>	Enríquez <sup>3</sup>	Luis <sup>4</sup>
Grasa (g L <sup>-1</sup> )	54.54 ± 0.85 <sup>a</sup>	50.04 ± 0.85 <sup>b</sup>	43.04 ± 0.85 <sup>c</sup>	44.02 ± 0.85 <sup>c</sup>
Sólidos no grasos (g L <sup>-1</sup> )	65.90 ± 0.48 <sup>b</sup>	73.22 ± 0.48 <sup>a</sup>	72.41 ± 0.48 <sup>a</sup>	73.73 ± 0.48 <sup>a</sup>
Proteína (g L <sup>-1</sup> )	20.86 ± 0.16 <sup>b</sup>	24.17 ± 0.16 <sup>a</sup>	24.25 ± 0.16 <sup>a</sup>	24.69 ± 0.16 <sup>a</sup>
Lactosa (g L <sup>-1</sup> )	38.46 ± 0.30 <sup>b</sup>	41.76 ± 0.30 <sup>a</sup>	40.97 ± 0.30 <sup>a</sup>	41.73 ± 0.30 <sup>a</sup>
Densidad (kg m <sup>-3</sup> )	1020.3 ± 0.15 <sup>c</sup>	1023.5 ± 0.15 <sup>b</sup>	1023.7 ± 0.15 <sup>ab</sup>	1024.1 ± 0.15 <sup>a</sup>
Acidez (g L <sup>-1</sup> de ácido láctico)	20.78 ± 0.43 <sup>ab</sup>	19.41 ± 0.43 <sup>bc</sup>	21.63 ± 0.43 <sup>a</sup>	18.75 ± 0.43 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Alimentación diversificada Bellotas (*Quercus ilex*), pastos Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Lolio (*Lolium multiflorum*). <sup>2</sup>Alimentación con Morera (*Morus alba*), bagazo de naranja (*Citrus sinensis*), Pasto Taiwan *Pennisetum purpurem*). <sup>3</sup>Alimentación con Alfalfa (*Medicago sativa*) y rastrojo de maíz (*Zae mays*). <sup>4</sup>Alimentación diversificada, bejuco (*Cissu verticillata*) y King grass (*Saccharum sinense*). Literales diferentes en fila indican diferencias significativas.

Hnos. Enríquez (72.41, 24.25 y 40.97 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) y Luis (73.73, 24.69 y 41.73 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). Sin embargo, en la UPC Rincón del Río Frío, las variables fisicoquímicas Sólidos No Grasos, Proteína y Lactosa (65.90, 20.86 y 38.46 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) mostraron un efecto contrario al resto de las leches producidas en el resto de las UPC. Este resultado puede atribuirse a dos razones: 1) el uso de forrajes de calidad deficiente y 2) a los gastos energéticos de las cabras derivados por el pastoreo (Park *et al.*, 2007; Inglingstad *et al.*, 2014). En el caso de la Densidad se observó que las leches producidas en las UPC Donelo (1023.54 kg m<sup>-3</sup>), Hnos. Enríquez (1,023.54 kg m<sup>-3</sup>) y Luis (1,023.54 kg m<sup>-3</sup>) estuvieron próximos al valor de 1,028 kg m<sup>-3</sup> propuesto por Park *et al.* (2007). Sin embargo, la leche de la UPC Rincón del Río Frío presentó el valor más bajo de Densidad (1020.25 kg m<sup>-3</sup>). Acorde a Park *et al.* (2007) este efecto pudo estar asociado a dos factores: 1) al estado avanzado de lactancia de las cabras y 2) a la adición de agua a la leche. Respecto al contenido de Acidez las leches producidas en las UPC Hnos. Enríquez y Rincón del Río Frío (21.63 y 20.78 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico) presentaron los mayores contenidos respecto las leches de las UPC Donelo y Luis (19.41 y 18.75 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico). Los valores de Acidez de esta investigación son superiores al valor de 15 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico observado por Villalobos y Castro (2009). Los contenidos altos de Acidez de las leches producidas principalmente en la UP Hnos. Enríquez y Rincón del Río Frío pudieron estar asociados a la contaminación microbiológica o a la falta de implementación de las buenas prácticas de higiene y manejo de la leche. Los efectos del Tipo de leche (TL) se observa en la Tabla 8. En donde se muestran diferencias significativas (p<0.05) solamente en el contenido de Grasa, Sólidos No Grasos y Lactosa. Adicionalmente la leche pasteurizada tuvo un mayor contenido de Grasa (48.32 vs 50.83 g L<sup>-1</sup>), Sólidos No Grasos (70.80 vs 71.81 g L<sup>-1</sup>), Proteína (23.38 vs 23.60 g L<sup>-1</sup>),

**Tabla 8.** Composición de la leche de cabra por tipo de leche en la zona centro del estado de Veracruz.**Table 8.** Composition of goat's milk by type of milk at the Veracruz state central zone

Variable	Tipo de Leche	
	Cruda	Tratamiento Térmico <sup>1</sup>
Grasa (g L <sup>-1</sup> )	46.66 ± 0.60 <sup>b</sup>	49.17 ± 0.60 <sup>a</sup>
Sólidos no grasos (g L <sup>-1</sup> )	70.81 ± 0.34 <sup>b</sup>	71.82 ± 0.34 <sup>a</sup>
Proteína (g L <sup>-1</sup> )	23.39 ± 0.11 <sup>a</sup>	23.60 ± 0.11 <sup>a</sup>
Lactosa (g L <sup>-1</sup> )	40.38 ± 0.21 <sup>b</sup>	41.09 ± 0.21 <sup>a</sup>
Densidad (kg m <sup>-3</sup> )	1022.8 ± 0.11 <sup>a</sup>	1023.0 ± 0.11 <sup>a</sup>
Acidez (g L <sup>-1</sup> de ácido láctico)	19.97 ± 0.30 <sup>a</sup>	20.22 ± 0.30 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Pasteurización a 63 °C por 30 min. Literales diferentes en fila indican diferencias significativas.

Lactosa (40.37 vs 41.08 g L<sup>-1</sup>) y Densidad (1022.79 vs 1023.0 kg m<sup>-3</sup>). De acuerdo con Villalobos (2005), el tratamiento térmico de la leche (65 °C por 0.5 h) puede generar una mayor concentración de sólidos que a su vez modifican la densidad de la leche. Para el efecto de la interacción EP\*TL no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas. Los resultados del efecto UPC\*TL se muestran en la Tabla 9. Se observa que los contenidos de Sólidos No Grasos, Proteína, Lactosa y Densidad tuvieron un efecto significativo (p < 0.05). Encontrándose su mayor concentración en las leches crudas y pasteurizadas de las UPC Donelo y Hnos. Enríquez. Esto puede asociarse al tipo de alimentación (morera, cascara de naranja, pasto Taiwán, alfalfa y rastrojo de maíz) usado en estas unidades de producción que contribuyen a incrementar dichos contenidos (Ramírez-Rivera *et al.*, 2018). Respecto a Densidad, las leches

**Tabla 9.** Efecto de la interacción *UPC\*TL* en aspectos fisicoquímicos de la leche de cabra de la zona montañosa central del estado de Veracruz.  
**Table 9.** Effect of the *UPC\*TL* interaction on physicochemical aspects of goat's milk from the central mountainous area of the state of Veracruz.

<i>UPC*TL</i>	Grasa (g L <sup>-1</sup> )	Sólidos no grasos (g L <sup>-1</sup> )	Proteína (g L <sup>-1</sup> )	Lactosa (g L <sup>-1</sup> )	Densidad (kg m <sup>-3</sup> )	Acidez (g L <sup>-1</sup> de ácido láctico)
Rincón del Río Frio-LC	53.45 ± 1.20 <sup>a</sup>	67.86 ± 0.68 <sup>e</sup>	21.65 ± 0.22 <sup>g</sup>	39.45 ± 0.42 <sup>de</sup>	1021.04 ± 0.21 <sup>f</sup>	20.55 ± 0.60 <sup>a</sup>
Rincón del Río Frio-LP	55.63 ± 1.20 <sup>a</sup>	63.93 ± 0.68 <sup>f</sup>	20.06 ± 0.22 <sup>h</sup>	37.46 ± 0.42 <sup>f</sup>	1019.47 ± 0.21 <sup>g</sup>	20.99 ± 0.60 <sup>a</sup>
Donelo-LC	48.16 ± 1.20 <sup>a</sup>	71.88 ± 0.68 <sup>d</sup>	23.80 ± 0.22 <sup>cef</sup>	40.94 ± 0.42 <sup>bcd</sup>	1023.17 ± 0.21 <sup>cd</sup>	18.48 ± 0.60 <sup>a</sup>
Donelo-LP	51.92 ± 1.20 <sup>a</sup>	74.54 ± 0.68 <sup>b</sup>	24.53 ± 0.22 <sup>b</sup>	42.58 ± 0.42 <sup>a</sup>	1023.90 ± 0.21 <sup>abc</sup>	20.32 ± 0.60 <sup>a</sup>
Enríquez-LC	42.13 ± 1.20 <sup>a</sup>	72.51 ± 0.68 <sup>cd</sup>	24.36 ± 0.22 <sup>bc</sup>	40.93 ± 0.42 <sup>bcd</sup>	1023.78 ± 0.21 <sup>abcd</sup>	21.59 ± 0.60 <sup>a</sup>
Enríquez-LP	43.95 ± 1.20 <sup>a</sup>	72.3 ± 0.68 <sup>cd</sup>	24.14 ± 0.22 <sup>bcd</sup>	41.01 ± 0.42 <sup>bcd</sup>	1023.58 ± 0.21 <sup>ab</sup>	21.65 ± 0.60 <sup>a</sup>
Luis-LC	42.87 ± 1.20 <sup>a</sup>	70.96 ± 0.68 <sup>cd</sup>	23.72 ± 0.22 <sup>cd</sup>	40.17 ± 0.42 <sup>bcd</sup>	1023.18 ± 0.21 <sup>bcd</sup>	19.23 ± 0.60 <sup>a</sup>
Luis-LP	45.15 ± 1.20 <sup>a</sup>	76.5 ± 0.68 <sup>a</sup>	25.66 ± 0.22 <sup>a</sup>	43.28 ± 0.42 <sup>a</sup>	1025.06 ± 0.21 <sup>e</sup>	17.9 ± 0.60 <sup>a</sup>

*UPC\*TL*: Unidad de producción caprina por Tipo de leche. LC: Leche cruda. LP: Leche pasteurizada (63 °C por 30 min). Literales diferentes en columna indican diferencias significativas.

(crudas y pasteurizadas) de las UPC Donelo, Hnos. Enríquez y Luis están por debajo de los valores de 1028 kg m<sup>-3</sup>, 1029 – 1033 y 1028 kg m<sup>-3</sup>, indicados por Park *et al.* (2007), Iancu (2010) y Chen *et al.* (2014). Por último, para la variable Acidez no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las leches producidas por unidades de producción caprina.

## CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación confirman el uso de buenas prácticas de ordeña aplicadas en la producción de leche de cabra de la zona analizada, esto quedó confirmado por la ausencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ssp y *Brucella* sp. El efecto de la interacción Época del año por Unidad de producción por Tipo de leche mostro que el 50 % de las leches (crudas y pasteurizadas) producidas en las épocas de norte y lluvias presentaron los mayores contenidos de Mesófilos aerobios y Coliformes totales. En los aspectos fisicoquímicos, el efecto de la interacción unidad de producción por tipo de leche se presentaron los mayores contenidos de sólidos no grasos, proteínas, lactosa y densidad debido a uso de diferentes forrajes como morera, cascaras de naranja, pasto Taiwán, alfalfa y rastrojo de maíz. Sin embargo, los mayores contenidos de grasa se encontraron en las unidades de producción Donelo (Coatepec) y Rincón del Río Frio (Tatatila). Los hallazgos antes expuestos pueden ser de interés para la industria láctea caprina así como para los caprinocultores dedicados a la producción de leche y productos derivados (quesos, cajetas, entre otros) con la finalidad de implementar un mayor control de calidad tanto microbiológica como fisicoquímica en la leche de cabra.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los productores del Sistema Especie Caprina del estado de Veracruz (SIPECV) por la donación de las muestras de leche para la realización de esta investigación.

## FINANCIAMIENTO

Esta investigación fue apoyada por el Colegio de Postgraduados a través del Fideicomiso de Administración e Inversión No. 167304 y por el Consejo Nacional de Ciencia

y Tecnología (CONACYT) institución financiadora de la beca doctoral para el autor de correspondencia.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses relacionados con esta publicación.

## REFERENCIAS

- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis Method 966.23, 991.14, 2003.08 y 947.05. 18th ed. AOAC International.
- Bidot Fernández, A. 2017. Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. Revista de Producción Animal. 29(2):32-41.
- Brodziak, A., Król, J., Barłowska, J. y Litwińczuk, Z. 2014. Effect of production season on protein fraction content in milk of various breeds of goats in Poland. International Journal of Dairy Technology. 67(3):410-419. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12130>.
- Chen, B., Lewis, M.J. y Grandison, A.S. 2014. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. Food Chemistry. 158:216-223. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.02.118>.
- Delgado-Pertiñez, M., Alcalde, M.J., Guzmán-Guerrero, J.L., Castel, J.M., Mena, Y. y Caravaca, F. 2003. Effect of hygiene-sanitary management on goat milk quality in semi-extensive systems in Spain. Small Ruminant Research. 47(1):51-61. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00239-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00239-0).
- FAO. 2010. Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector A Life Cycle Assessment.
- Fekadu, B., Soryal, K., Zeng, S., van Hekken, D., Bah, B. y Villaquiran, M. 2005. Changes in goat milk composition during lactation and their effect on yield and quality of hard and semi-hard cheeses. Small Ruminant Research. 59(1):55-63. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2004.12.003>.
- Gaucher, I., Boubellouta, T., Beaucher, E., Piot, M., Gaucheron, F. y Dufour, E. 2008. Investigation of the effects of season, milking region, sterilisation process and storage conditions on milk and UHT milk physico-chemical characteristics: a multidimensional statistical approach. Dairy Science and Technology. 88(3):291-312. <https://doi.org/10.1051/dst:2007022>.
- Goetsch, A.L., Zeng, S.S. y Gipson, T.A. 2011. Factors affecting goat milk production and quality. Small Ruminant Research. 101(1-3):55-63. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2011.09.025>.



- Grimley, H., Grandison, A. y Lewis, M. 2009. Changes in milk composition and processing properties during the spring flush period. *Dairy Science & Technology*. 89(3):405-416. <https://doi.org/10.1051/DST/2009016>.
- Iancu, R. 2010. Monitoring goat milk physico-chemical composition during season using analyzer ekomilk total. *Annals of RSCB*. 15(2):332-336.
- INEGI, 2007. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007.
- Inglingstad, R.A., Steinshamn, H., Dagnachew, B.S., Valenti, B., Criscione, A., Rukke, E.O., Devold, T.G., Skeie, S.B. y Vegarud, G.E. 2014. Grazing season and forage type influence goat milk composition and rennet coagulation properties. *Journal of Dairy Science*. 97(6):3800-3814. <https://doi.org/10.3168/JDS.2013-7542>.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P. y Drosinos, E.H. 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*. 21(6):805-815. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2009.11.015>.
- Mayer, H.K. y Fiechter, G. 2011. Physicochemical characteristics of goat's milk in Austria – seasonal variations and differences between six breeds. *Dairy Science & Technology*. 92(2):167-177. <https://doi.org/10.1007/S13594-011-0047-0>.
- Midau, A., Kibon, A., Moruppa, S.M. y Augustine, C. 2010. Influence of Season on Milk Yield and Milk Composition of Red Sokoto Goats in Mubi Area of Adamawa State, Nigeria. *International Journal of Dairy Science*. 5(3):135-141. <https://doi.org/10.3923/IJDS.2010.135.141>.
- Morales-Pablo, R., Avalos de la Cruz, D.A., Leyva-Ruelas, G. e Ybarra-Moncada, Ma.C. 2012. Calidad bacteriológica de leche cruda de cabra producida en Miravalles, Puebla. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(1):45-54.
- Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M. y le Frileux, Y. 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68(1-2):20-34. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2006.09.019>.
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. [Consultado 23 de septiembre 2021] 1995. Disponible en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4896374&fecha=20/08/1996](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4896374&fecha=20/08/1996)
- Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Leche pasteurizada de vaca. [Consultado 23 de septiembre 2021] 1995. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4881855&fecha=22/09/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881855&fecha=22/09/1995)
- Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994. Toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para análisis microbiológico. [Consultado 23 de septiembre 2021] 1995. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4881801&fecha=21/09/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881801&fecha=21/09/1995)
- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Determinación de Salmonella en alimentos. [Consultado 23 de septiembre 2021] 1995. Disponible en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4728936&fecha=15/08/1994](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4728936&fecha=15/08/1994)
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Métodos de prueba. [Consultado 23 de septiembre 2021] 2010. Disponible en: <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M. y Haenlein, G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68(1-2):88-113. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2006.09.013>.
- Ramírez-Rivera, E. de J., Lopez-Collado, J., Díaz-Rivera, P., Ortega-Jiménez, E., Torres-Hernández, G., Jacinto-Padilla, J. y Herman-Lara, E. 2017. A multi-criteria approach to identify favorable areas for goat production systems in Veracruz, México. *Tropical Animal Health and Production*. 49(4):725-731. <https://doi.org/10.1007/S11250-017-1249-0>.
- Ramírez-Rivera, E. de J., Ramón-Canul, L.G., Torres-Hernández, G., Herrera-Corredor, J.A., Juárez-Barrientos, J.M., Rodríguez-Miranda, J., Herman-Lara, E. y Díaz-Rivera, P. 2018. Typing aged goat cheeses produced in the mountainous central region of the state of Veracruz, Mexico. *Agrociencia*. 52(1):15-34.
- Ramírez-Rivera, E.J., Juárez-Barrientos, J.M., Rodríguez-Miranda, J., Díaz-Rivera, P., Ramón-Canul, L.G., Herrera-Corredor, J.A., Hernández-Serrano, M.I. y Lara, E.H.Y. 2017. Typification of a fresh goat cheese of Mexico by path models. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 41(2):213-220.
- Ramírez-Rivera, E. J., Ramón-Canul, L. G., Torres-Hernández, G., Herrera-Corredor, J. A., Juárez-Barrientos, J. M., Rodríguez-Miranda, J., Herman-Lara, E. y Díaz-Rivera, P. 2018. Typing aged goat cheese produced in the mountainous central region of the state of Veracruz, Mexico. *Agrociencia*. 52: 15-34.
- Ruiz Romero, R.A., Cervantes Olivares, R.A., Ducoing Watty, A.E., Hernández Andrade, L. y Martínez Gómez, D. 2013. Principales géneros bacterianos aislados de leche de cabra en dos granjas del municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 4(1):93-106.
- Salinas-González, H., Daniel, E., Moysen, V., de Los, M., De, A., Miramontes, S., Gerardo, F., Deras, V., Maldonado Jáquez, J.A., Iván, L., Monroy, V., Torres Hernández, G., Maconetzin, L., Requejo, I. y Figueroa Viramontes, U. 2016. Descriptive analysis of goat production units in the southwest of the laguna region, Coahuila, México. *Interciencia*, 41:763-768.
- Salvador, A., Igual, M., Contreras, C., Martínez-Navarrete, N. y del Mar Camacho, M. 2014. Effect of the inclusion of citrus pulp in the diet of goats on cheeses characteristics. *Small Ruminant Research*. 121(2-3):361-367. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2014.06.012>.
- Salvador, A. y Martínez, G. 2007. Factores que Afectan la Producción y Composición de la Leche de Cabra: Revisión Bibliográfica. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 48(2):61-76.
- SAS, 2002. SAS/STAT users guide: Statics, Version 9.4.
- Steinshamn, H., Inglingstad, R.A., Ekeberg, D., Mølmann, J. y Jørgensen, M. 2014. Effect of forage type and season on Norwegian dairy goat milk production and quality. *Small Ruminant Research*. 122(1-3):18-30. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2014.07.013>.
- Todaro, M., Scatassa, M.L. y Giaccone, P. 2005. Multivariate factor analysis of Girgentana goat milk composition. *Italian Journal of Animal Science*. 4(4):403-410. <https://doi.org/10.4081/IJAS.2005.403>.
- Tormo, H., Agabriel, C., Lopez, C., Lekhal, D.A.H. y Roques, C. 2011. Relationship between the production conditions of goat's milk and the microbial profiles of milk. *International Journal of Dairy Science*. 6(1):13-28. <https://doi.org/10.3923/IJDS.2011.13.28>.

Villalobos, R.A. 2005. Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*. 16(2):239-252. <https://doi.org/10.15517/AM.V16I2.11878>.

Villalobos, R.A. y Castro, M.L.P. 2009. Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo "Crottin de Chavignol." *Agronomía Mesoamericana*. 20(2):297-309. <https://doi.org/10.15517/AM.V20I2.4946>.

Yamazi, A.K., Moreira, T.S., Cavicchioli, V.Q., Burin, R.C.K. y Nero, L.A. 2013. Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk. *Small Ruminant Research*. 113(1):205-210. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2013.02.004>.

## Desarrollo y caracterización de películas activas con nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis verde

Development and characterization of active films with silver-nanoparticles obtained by green synthesis

Enna B. Estudillo-Díaz<sup>1</sup>, Federico A. Gutiérrez-Miceli<sup>1</sup>, Daniel González-Mendoza<sup>2</sup>, Benjamín Valdez-Salas<sup>3</sup>, Miguel Abud-Archila<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Tecnológico Nacional de México/IT de Tuxtla Gutiérrez, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Carretera Panamericana km. 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, C.P. 29050, México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ciencias Agrícolas, Ejido Nuevo León, Baja California, C.P. 21705, México.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, Baja California, C. P. 21100, México.

### RESUMEN

El uso de películas comestibles es una tecnología para alargar la vida útil de los alimentos. La adición de nanopartículas de plata (AgNPs) podría mejorar el desempeño de películas comestibles y evitar el crecimiento de microorganismos que podrían afectar a los alimentos. El objetivo fue elaborar y caracterizar AgNPs mediante síntesis verde y evaluar el efecto de su adición sobre las propiedades mecánicas y de barrera de películas formadas a partir de proteína de *Cajanus cajan* y goma de la semilla de *Tamarindus indica*. Para la síntesis de AgNPs se utilizó extracto acuoso de *Annona muricata*. Tres diferentes formulaciones de películas se elaboraron las cuales contenían AgNPs, extracto acuoso de guanábana y agua (control). Las películas fueron evaluadas en términos de su permeabilidad al vapor de agua (WVP), color, opacidad y propiedades mecánicas. Las AgNPs incrementaron el doble el módulo de Young de las películas (0.0675 MPa) y la fuerza de tensión (2.84 MPa) con respecto al control. Además, las AgNPs influyeron estadísticamente en el color y opacidad de la película. Sin embargo, no se observaron diferencias en la PVA. La adición de AgNPs a recubrimientos podría ser una opción para incrementar la vida útil de alimentos.

**Palabras clave:** *Cajanus cajan*, nanopartículas de plata, goma de tamarindo.

### ABSTRACT

The use of edible films is a technology to extend the shelf life of food. The addition of silver nanoparticles (AgNPs) could improve the performance of edible films and avoid the growth of microorganisms that could affect food. The objective was to elaborate and characterize AgNPs by green synthesis and to evaluate the effect of their addition on the mechanical and barrier properties of films formed from *Cajanus cajan* protein and *Tamarindus indica* seed gum. An aqueous extract of *Annona muricata* leaves was used for green synthesis. Three films were developed containing AgNPs, aqueous extract of *Annona muricata* leaves and water (control). Films were evaluated by their water vapour permeability (WVP), color, opacity and mechanical properties. The

AgNPs increased two-fold the Young's module (0.0675 MPa) and the tensile strength (2.84 MPa) in relation to control film. Moreover, the AgNPs influenced also the color and opacity of the films. However, no differences were observed in the WVP. The addition of AgNPs to films, could be an option to increase the shelf life of foods.

**Keywords:** *Cajanus cajan*, tamarind gum, silver nanoparticles.

### INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, la utilización de materiales en la industria alimentaria elaborados a base de petróleo es un problema ambiental grave. Por lo anterior, el uso de recursos naturales biodegradables como las películas comestibles para extender la vida útil y la calidad de los alimentos ha incrementado (Suput *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, aproximadamente del 20 al 30 % de los productos hortofrutícolas producidos en el mundo se pierde debido al deterioro microbiológico y fisiológico (Salehi, 2020), por lo que el uso de nuevas tecnologías que eviten o minimicen el deterioro hoy en día es un reto. Una de las tecnologías empleadas para evitar el deterioro fisiológico y microbiológico es el uso de películas comestibles. Sin embargo, estas películas deben de tener un comportamiento de barrera semipermeable a gases como CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, etileno y al vapor de agua (Robles-Flores *et al.*, 2018), además de presentar propiedades mecánicas, ópticas y antimicrobianas adecuadas para el producto en el cual se aplicará (Mohamed *et al.*, 2020). Estas propiedades de las películas frecuentemente dependen de los materiales utilizados para la formulación. Por lo anterior, diversos autores han adicionado diversos materiales: como compuestos activos como antimicrobianos (Madera-Santana *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2020), aceites esenciales (Xue *et al.*, 2019) y nanocompuestos (Osorio-Echavarría *et al.*, 2017), entre otros. En cuanto al uso de nanopartículas de plata (AgNPs), diversos trabajos han reportado la adición de AgNPs a películas modificando sus propiedades. Bahrami *et al.* (2019) reportaron el aumento en la elongación, así como el grosor de la película, además de mostrar la disminución de la fuerza de tracción,

\*Autor para correspondencia: Miguel Abud Archila  
 Correo electrónico: miguel.aa@tuxtla.tecnm.mx

Recibido: 31 de marzo de 2022

Aceptado: 29 de julio de 2022

la luminosidad y la PVA de películas a base de tragacanto/hidroxipropil metil-celulosa/cera de abeja adicionada con AgNPs (US Research nanomaterials, Inc) . Sin embargo, otros estudios han reportado que la adición de nanopartículas de cobre-plata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aumenta la resistencia a la tracción y una disminución en la elongación, así como la disminución de la luminosidad de la película (Arfat *et al.*, 2017). Estas nanopartículas son elaboradas frecuentemente por síntesis química, sin embargo, pocos trabajos han reportado el uso de nanopartículas mediante síntesis verde. El interés de las nanopartículas comúnmente llamadas nanopartículas verdes radica en que su proceso de obtención es de bajo costo, no requiere infraestructura especializada para la elaboración, el proceso es amigable con el medio ambiente y sobre todo que se han reportado con actividad antimicrobiana (Jalab *et al.*, 2021).

Debido a que no se ha reportado el efecto de AgNPs, obtenidas mediante síntesis verde con extracto de *Annona muricata* (guanábana), sobre las propiedades de películas, el objetivo de este trabajo fue elaborar y caracterizar nanopartículas de plata mediante síntesis verde utilizando extracto acuoso de hojas de guanábana y evaluar el efecto de su adición sobre las propiedades mecánicas y de barrera de películas formadas a partir de proteína de *Cajanus cajan* (guandul) y goma de la semilla de tamarindo (*Tamarindus indica*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materias primas

Los granos de guandul se adquirieron en un mercado de la ciudad de Tapachula, Chiapas, México y la proteína se extrajo mediante la metodología reportada por Robles-Flores *et al.* (2018). La goma de semillas de tamarindo fue obtenida a partir de semilla de *Tamarindus indica* adquiridas en el mercado local (Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México), y se obtuvo según la metodología reportada por Robles-Flores *et al.* (2018).

### Obtención del extracto acuoso

Las hojas de guanábana fueron colectadas en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Las hojas fueron secadas a la sombra a 40 °C hasta obtener una humedad de 10 %. Posteriormente, las hojas secas fueron pulverizadas hasta un tamaño de partícula de malla 60 (0.250 mm) y guardadas en bolsas herméticas al vacío hasta su utilización. El extracto acuoso se preparó usando la metodología descrita por Chang *et al.* (2002).

### Preparación de las AgNPs

Las AgNPs fueron preparadas siguiendo la metodología descrita por Ruiz-Romero *et al.* (2018). El coloide (sobrenadante) se almacenó a 4 °C en oscuridad, hasta su posterior uso.

### Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante

Para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides, el extracto acuoso se diluyó con agua tridestilada en proporción 1:5 v:v (extracto:agua). Para la determinación de fenoles totales en el extracto acuoso y en las AgNPs, se usó la metodología reportada por Singleton *et al.* (1999). Para la cuantificación de flavonoides en el extracto acuoso y en las AgNPs se usó el método colorimétrico de cloruro de aluminio (Chang *et al.*, 2002). Para la determinación de la capacidad antirradical del extracto acuoso se usó la metodología reportada por Zhao y Shah (2014).

### Espectrofotometría de luz UV-visible

Las AgNPs fueron analizadas en un espectro (UV-visible) con un barrido de 300 a 700 nm en un espectrofotómetro Beckman coulter modelo DU 730 (Indianapolis, EU), a intervalos de 5 nm y usando AgNO<sub>3</sub> como blanco.

### Potencial zeta y dispersión dinámica de la luz (DLS)

La distribución de tamaño de las AgNPs y el potencial zeta se analizaron utilizando un Nanotrak Wave Instrument (Montgomeryville, PA, EU). Las mediciones se realizaron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz en un rango de 0.1 – 1000 nm a 25 °C, con una longitud de onda del láser de 780 nm y un ángulo de dispersión de 90 °. Los datos de DLS se analizaron mediante el software operativo Microtrak FLEX (Montgomeryville, PA, EU).

### Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Para el registro de las microfotografías se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB), modelo JEOL-6010LA (Massachusetts, EU), con un voltaje de 10 kV con una magnificación de 100.00 kx utilizando un detector de electrones secundarios (SEI). Después de tomar las imágenes con el MEB, se procedió a ejecutar un barrido de haz de electrones y se registraron espectrografías y la distribución de los elementos químicos identificados con el detector de energía dispersa (EDS).

### Formulación de las películas

Los recubrimientos fueron formulados según la metodología reportada por Robles-Flores *et al.* (2018) con modificaciones. Tres formulaciones fueron probadas como se presentan en la Tabla 1.

### Caracterización de las películas

Antes de realizar las determinaciones, las películas fueron estabilizadas a 25 °C y una humedad relativa (HR) de 53 % durante 48 h. Esta HR fue proporcionado con una solución saturada de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

### Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de la película se determinó de acuerdo a la metodología descrita por ASTM E96M-16 (2016).



**Tabla 1.** Formulación de películas.**Table 1.** Films formulation.

Película	Aislado de proteína (g/dL de sfp)	Goma Tamarindus indica (g/dL de sfp)	Glicerol (g/100 dL de sfp)	Extracto (% v/v)	AgNPs (% v/v)
TE	10	1	5.5	25	-
TN	10	1	5.5	-	25
T	10	1	5.5	-	-

Sfp = Solución formadora de película.

T es la película control, TE es la película con extracto de *Annona muricata* y TN es la película con AgNPs.

### Opacidad

La opacidad se determinó colocando una lámina de la película de 4 x 1 cm<sup>2</sup> dentro de una celda espectrofotométrica, asegurando que la lámina cubriera completamente la cara de la celda, y se realizó un barrido a lo largo del rango visible (400 - 800 nm) empleando un espectrofotómetro Beckman coulter modelo DU 730 (California, EU). La opacidad se reportó como el área bajo la curva como unidades de absorbancia en función del espesor de la película (mm<sup>-1</sup>).

### Color

El color de las películas fue medido utilizando un colorímetro portátil Konica minolta modelo CM-2500d (Tokio, Japón) por triplicado, según la escala CIE- Lab.

### Textura

La fuerza de tensión, elongación y módulo de Young de las películas se determinaron empleando un texturómetro Stable Micro Systems modelo TA.XT. plus (Godalming, UK) con una apertura de 30 mm, velocidad de 30 mm/min y deformación del 80 %.

### Microscopia electrónica de barrido (MEB) de las películas

Para el registro de las microfotografías de las películas se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM), modelo JEOL-6010LA (Massachusetts, EU), con un voltaje de 10 kV con una magnificación de 120x y 600x.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Formación de AgNPs

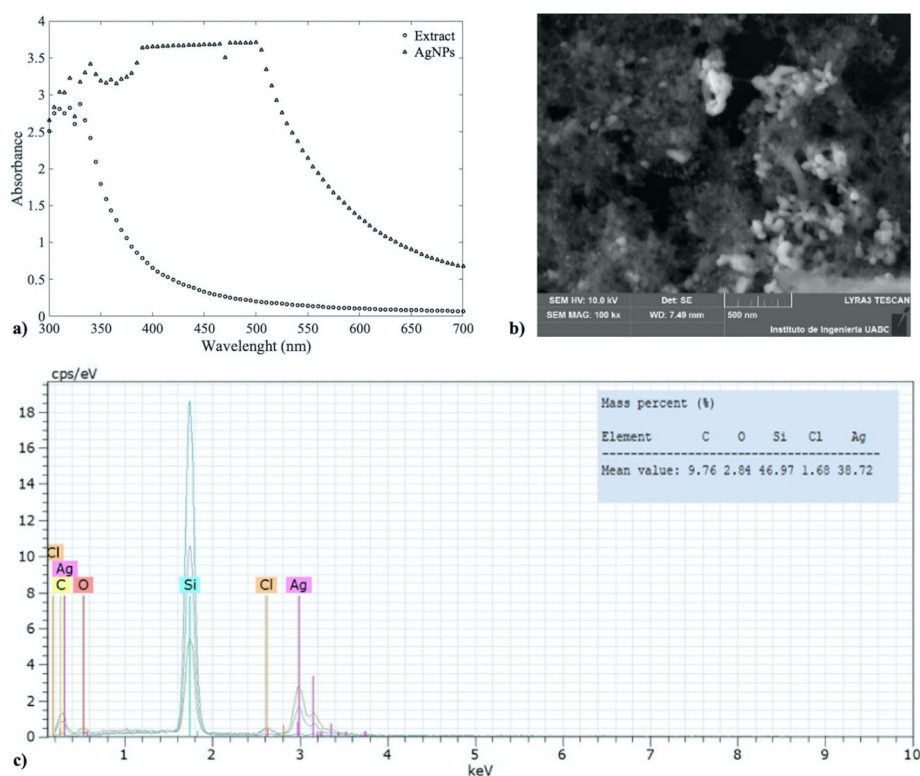
La formación de las AgNPs usando extracto de hoja de guanábana se demostró con un cambio en la coloración de la mezcla de amarillo claro a amarillo oscuro. Este cambio de coloración es indicativo de la reducción de los compuestos fenólicos del extracto y ha sido reportado por otros autores (Santhosh *et al.*, 2015; Gavamukulya *et al.*, 2020). Según John *et al.* (2017) el principal mecanismo en la síntesis de las nanopartículas es la óxido-reducción. Ellos muestran un posible mecanismo de acción para la formación de las AgNPs en los cuales los antioxidantes polifenólicos actúan como los agentes reductores en la síntesis verde de las nanopartículas.

El cambio de color del extracto después de la síntesis de las AgNPs es debido al fenómeno de resonancia del plasmón superficial (Cardeño y Londoño, 2014). Martínez

*et al.* (2015) describen a la resonancia plasmónica como un fenómeno en el que los electrones en la superficie de una nanopartícula metálica oscilan al interactuar con una onda electromagnética, induciendo un momento dipolar sobre la partícula en un intervalo de tiempo determinado. Cuando el componente eléctrico de la onda electromagnética que incide sobre la nanopartícula oscila a la misma frecuencia que los electrones de esta, ocurre el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie. Lo anterior fue identificado en las muestras de solución de plata y extracto de guanábana mediante un barrido espectrofotométrico de 300 a 700 nm, en donde fue posible registrar el efecto plasmón de la plata en la región de 470 nm (Figura 1a). En este sentido, el posible mecanismo de reducción del ión Ag<sup>+</sup> por los compuestos fenólicos en el extracto acuoso de guanábana, implica la ionización de polifenoles y la transferencia de un electrón al ion Ag<sup>+</sup>. Entonces, el ión Ag<sup>+</sup> podría ser reducido a Ag<sup>0</sup> (AgNPs) por acción de los compuestos bioactivos (fenoles y flavonoides). Los polifenoles entonces podrían actuar como antioxidantes, preservando a las nanopartículas (Erdogan *et al.*, 2019). En este sentido, nuestros resultados son consistentes con los reportados por León-Jimenez *et al.* (2019) quienes encontraron que la formación de nanopartículas podría deberse a grupos carboxilo de aminoácidos, proteínas y compuestos fenólicos que tienen la capacidad de reducir los iones metálicos y actuar como agentes de estabilizantes del complejo que se forma (Valdez-Salas *et al.*, 2020).

### Microscopía Electrónica de Barrido de las AgNPs y análisis de EDS

En la Figura 1b, se muestra la microfotografía de las nanopartículas a magnificaciones de 100 kx. En esta Figura se observan nanopartículas irregulares y aglomeradas. Esto podría ser debido a que en la síntesis verde no se puede controlar el tamaño, forma, ni distribución de las nanopartículas como lo reportado por Anandan *et al.* (2019). La espectroscopía de energía dispersa (Figura 1c) proporcionó información en cuanto a la composición elemental de la muestra analizada, con lo cual se determinó una composición media másica de las AgNPs de 9.76 % de carbono, 2.84 % de oxígeno, 46.97 de silicio, 1.68 % de cloro y 38.72 % de plata, confirmando así la síntesis. El pico de señal a 3 keV corresponde a las AgNPs debido a la resonancia de plasmón superficial (Tamilarasi y Meena, 2020). La presencia del Si es probable que provenga de contenido mineral del tejido vegetal de acuerdo a las condiciones de cultivo o crecimiento de la planta. Similares resultados fueron reportados previamente por Femi-Adepoju *et al.* (2019) y Valdez-Salas *et al.* (2020), quienes observaron la presencia de Si y otros elementos que sirven como estabilizadores orgánicos de la nanopartículas y su presencia responde de las condiciones de cultivo de las plantas. Los resultados obtenidos mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) indican que las nanopartículas presentaron una polaridad negativa y presentaron una conductividad promedio de 1332 μS /cm, un tamaño promedio de las nanopartículas de 64.6 nm y un potencial zeta de 29.1 mV. El potencial zeta es



**Figura 1.** a) Espectro UV - Visible de extracto de guanábana (círculos) y AgNPs (triángulos), b) Microfotografía de AgNPs y c) Análisis químico de la espectroscopia de energía dispersa (EDS) de AgNPs sintetizadas con extracto acuoso de *Annona muricata*.

**Figure 1.** a) UV - Visible spectrum of soursop extract (circles) and AgNPs (triangles), b) AgNPs Microphotograph, and c) Chemical analysis of dispersed energy spectroscopy of AgNPs synthesized with *Annona muricata* aqueous extract.

un parámetro fundamental que nos indica la interacción de la partículas en suspensión en una solución coloidal, las fuerzas de repulsión entre ellas producen suspensiones estables, mientras que cuando no hay repulsión entre las partículas se produce la aglomeración y por lo tanto la sedimentación de aglomerados. Para que esto no suceda, el potencial zeta debe ser mayor a + 30 mV o menor a - 30 mV para tener estabilidad coloidal según Emil y Gautam (2019). Los valores aquí reportados para nuestras AgNPs indican que hay repulsión entre las partículas en suspensión, sin embargo, se observa que empieza a ver aglomeración entre las nanopartículas.

### Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto acuoso y nanopartículas

En la Tabla 2 se presenta la caracterización del extracto acuoso y AgNPs. En esta Tabla 2 se puede observar que no hay diferencia estadística significativa en el contenido de fenoles totales y flavonoides. Estos resultados son menores a los reportados por Vergara Sotomayor *et al.* (2018) quienes obtuvieron 523.34 µg EAG/mL en fenoles totales y 0.76 µg EQ/mL en flavonoides en extracto acuoso de hojas de guanábana. Pero similar a lo reportado por Poma *et al.* (2011) quienes reportaron una concentración de 3.167 µg EQ/mL en hojas de guanábana. En cuanto a la actividad antioxidante del extracto acuoso fue de 69.08 %. La presencia de antioxidantes producidos por las plantas pueden inhibir o retrasar el

proceso de oxidación, actuando como captadores de radicales libres en los sistemas biológicos, dado a que se producen de forma natural, el riesgo de efectos secundarios es menor (Akhtar *et al.*, 2022). Es por ello que al tener una mayor actividad antioxidante en el extracto vegetal podría ser mayor la inhibición o el retraso en el estrés oxidativo celular.

### Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Los resultados mostraron que la PVA no fue afectada estadísticamente ( $p < 0.05$ ) con la adición del extracto ni con las nanopartículas (Tabla 3). Estos valores de permeabilidad son probablemente debido a la naturaleza hidrofílica de los

**Tabla 2.** Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante de extracto acuoso de *Annona muricata* y AgNPs.

**Table 2.** Total phenols content, flavonoids and antioxidant activity of *Annona muricata* aqueous extract and AgNPs.

	Fenoles totales µg EAG/mL	Flavonoides µg EQ/mL	Actividad antioxidante (%)
<b>Extracto acuoso</b>	0.3523 ± 0.0184 <sup>a</sup>	0.029 ± 0.0002 <sup>a</sup>	69.0864 ± 0.1769 <sup>b</sup>
<b>AgNPs</b>	0.3833 ± 0.0072 <sup>a</sup>	0.0238 ± 0.0031 <sup>a</sup>	ND
<b>DMS</b>	0.0602	0.0097	

ND= no determinado.

Letras minúsculas similares en una columna indican que no hay diferencia estadística entre los tratamientos.

**Tabla 3.** Permeabilidad al vapor de agua (PVA), luminosidad (L\*), valor b\*, valor a\*, opacidad, fuerza de estrés, elongación, y modulo de Young de películas obtenidas con diferentes formulaciones.**Table 3.** Water vapour permeability (WVP), luminosity (L\*), b\* value, a\* value, opacity, stress force, elongation, and Young module of films obtained with different formulations.

Película	PVA (g mm h <sup>-1</sup> kPa <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	L*	b*	a*	Opacidad (μm)	Fuerza de tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young (MPa)
T	5.04 ± 0.15 <sup>a</sup>	60.44 ± 0.34 <sup>a</sup>	27.2 ± 4.76 <sup>a</sup>	-2.92 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.17 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.477 ± 0.1496 <sup>a</sup>	45.2093 ± 5.219 <sup>a</sup>	0.0331 ± 0.0054 <sup>a</sup>
TE	5.04 ± 0.35 <sup>a</sup>	55.14 ± 1.26 <sup>b</sup>	29.78 ± 0.34 <sup>a</sup>	-2.11 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.15 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.9812 ± 0.1756 <sup>b</sup>	44.5993 ± 4.8309 <sup>a</sup>	0.0673 ± 0.0067 <sup>b</sup>
TN	5.32 ± 0.17 <sup>a</sup>	39.46 ± 0.66 <sup>c</sup>	24.49 ± 0.54 <sup>a</sup>	2.92 ± 0.1 <sup>c</sup>	6.54 ± 0.38 <sup>b</sup>	2.8459 ± 0.2083 <sup>b</sup>	42.3521 ± 4.802 <sup>a</sup>	0.0675 ± 0.0036 <sup>b</sup>
DMS	0.4911	1.6974	5.55	0.1828	0.6156	0.2015	5.5636	0.0061

Letras minúsculas similares en una columna indican que no hay diferencia estadística entre los tratamientos. T es la película control, TE es la película con extracto de *Annona muricata* y TN es la película con AgNPs.

componentes de las formulaciones como el glicerol debido a sus grupos funcionales (-OH). Estos valores de PVA fueron más elevados con lo reportados por Robles-Flores *et al.* (2018), quienes mostraron valores de 1.98 a 3.76 quienes usaron goma de *C. cajan*, esta diferencia puede deberse a que la goma usada en este trabajo fue de *T. indica*, la cual ha sido catalogada como un agente emulsionante aunado con el glicerol, pueden interactuar con las moléculas de agua e hidratar la película para posteriormente difundir el agua a través de la matriz de la película (Yamatoya *et al.*, 2020; Gahruie *et al.*, 2022), además, de la existencia de posibles grietas en la estructura de la película.

#### Apariencia, color y opacidad de las películas

La película TN con AgNPs presentó una coloración marrón oscuro mientras que las películas T y TE presentaron un color café claro. Este cambio de coloración se pudo deber probablemente a la interacción de compuestos fenólicos "libres" (aun en el coloide de las AgNPs) con los componentes de las películas (proteína y goma). En la Tabla 3 se muestran los resultados de la evaluación de color y opacidad de las películas. Los valores de luminosidad variaron de 39.46 a 60.44, mientras que los valores de "a" fueron de - 2.11 a 2.92 y los valores de "b" oscilaron entre los 24.49 a 29.78, para todas las películas. Con respecto a la luminosidad (L) y el parámetro "a" se observó que las películas fueron estadísticamente diferentes. La luminosidad de las películas disminuyó con la adición de extracto de guanábana y de AgNPs, provocando el incremento de la opacidad de las mismas con respecto a las películas sin extracto ni nanopartículas. Con respecto a la opacidad, los valores variaron de 4.15 para las películas sin extracto y sin nanopartículas hasta un valor de 6.54 mm<sup>-1</sup> para las películas con nanopartículas. Esto puede deberse a que en la síntesis de las nanopartículas pudieron haber quedado iones Ag<sup>+</sup> libres los cuales pudieron haber reducido o reaccionado con los componentes de la proteína, así como de la goma de tamarindo. Ledezma *et al.* (2014) mencionaron que los azúcares reductores y fenoles presentes en los extractos pueden actuar como agentes reductores para la síntesis de nanopartículas.

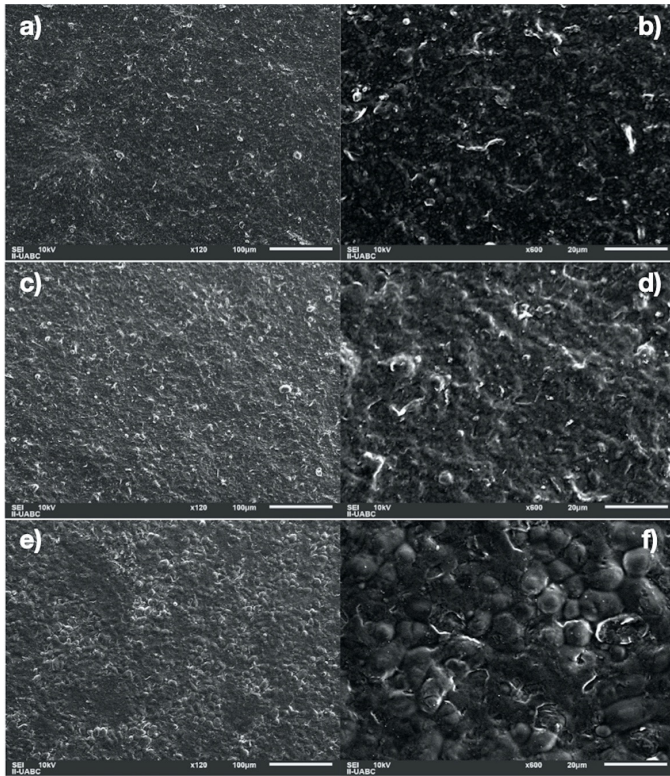
#### Estructura y propiedades mecánicas

Los resultados de las propiedades mecánicas se pueden apreciar en la Tabla 3. Nuestros valores de fuerza de tensión (entre 1.477 y 2.981 MPa) fueron más bajos que los reportados por Cano *et al.* (2016) quienes reportaron valores de entre 18.3 y 30.7 MPa para películas elaboradas con poli-vinil-alcohol, almidón y AgNPs a diferentes concentraciones. Ellos atribuyen esta fuerza de tensión a la absorción de la plata a las cadenas poliméricas mediante interacciones de Van der Waals con los grupos -OH, así como a la carga parcial positiva en la superficie de las AgNPs.

La adición de nanopartículas incrementó la fuerza de tensión de las películas. Sin embargo, este efecto no siempre es el mismo. Bahrami *et al.* (2019) mencionaron que la incorporación de nanopartículas metálicas en las películas de biopolímeros puede disminuir la fuerza de tensión de la película cuando los componentes de la misma no son compatibles. Lo anterior debido a que no se crea una fuerte interacción entre las nanopartículas y la matriz de los polímeros. Por lo tanto, se puede concluir que el aumento a la fuerza de tensión es por la interacción química entre el aislado de proteína y la goma de tamarindo, con el extracto vegetal y las AgNPs junto con el glicerol aumentando la estructura de la red en las películas formuladas. La deformación o elongación es un parámetro que muestra el porcentaje en el que un material se puede alargar, los resultados muestran que no hubo diferencia estadística significativa entre las películas (Tabla 3). Este resultado es interesante debido a que a pesar de que las películas son más resistentes, estas no perdieron elasticidad. Las propiedades mecánicas de las películas elaboradas están estrechamente relacionadas con la distribución y densidad de las interacciones intermoleculares e intramoleculares en las cadenas de polímeros en la matriz de la película (Orsuwan *et al.*, 2016). El módulo de Young (E) según Pérez-González (2014) lo definen como "el parámetro característico de cada material que indica la relación existente entre los incrementos de tensión aplicados y los incrementos de deformación longitudinal unitaria producidos, indicando la rigidez de un material: cuando más rígido es un material mayor es su módulo de Young". Por lo tanto, los valores del módulo de Young de las películas TE y TN fueron estadísticamente diferentes



con respecto a la película control T, como sucedió con la fuerza de tensión. Esto es probablemente debido a que estas dos películas contienen mayor número de grupos hidroxilos expuestos y disponibles para interactuar con el resto de los componentes de la formulación durante el reordenamiento a lo largo del secado, permitiendo una película más compacta, como lo reportado por Robles-Flores *et al.* (2018). Lo compacto de las películas puede observarse en la Figura 2 donde se aprecian las microfotografías que muestran la estructura individual de las películas a 120x (Figuras 2a, 2c y 2e) y 600x (Figuras 2b, 2d y 2f). En las microfotografías se pueden observar que las películas son lisas, homogéneas y compactas.



**Figura 2.** Microfotografía de la película T a x120 (a) y x600 (b); Microfotografía de la película TE a x120 (c) y x600 (d); Microfotografía de la película TN a x120 (e) y x600 (f).

**Figure 2.** T- film Microphotograph at x120 (a) and x600 (b); TE- film microphotograph at x120 (c) and x600 (d); TN- film microphotograph at x120 (e) and x600 (f).

## CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado se puede concluir que el extracto acuoso de hojas de *Annona muricata* contiene compuestos reductores de los iones plata permitiendo la obtención de AgNPs estables. Los resultados mostraron que el extracto vegetal y las AgNPs refuerzan la estructura mecánica de las películas sin detrimento de sus propiedades de barrera al vapor de agua. Sin embargo, la adición de las AgNPs tuvo un efecto negativo en el color, por lo cual es necesario realizar más pruebas para la eliminación del oscurecimiento de las películas. Finalmente, la adición de AgNPs obtenidas mediante síntesis verde en las películas puede desarrollar características mecánicas y de barrera prometedoras para el empleo de películas preformadas usándolas como

empaques de algún alimento en específico. Sin embargo, se recomienda realizar estudios dirigidos a probar la toxicidad de las películas con AgNPs sintetizadas y estudios sobre su actividad antimicrobiana, como un paso posterior hacia la utilización de estas películas con nanopartículas en la conservación de alimentos.

## REFERENCIAS

- Akhar, M., Rafiullah, M., Shehata, W., Hossain, A. y Ali, M. 2022. Comparative phytochemical, thin layer chromatographic profiling and antioxidant activity of extracts from some Indian herbal drugs. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2022.01.001>
- Anandan, M., Poorani, G., Varunkumar, K., Anil-Chuturgoon, A., Saravanan, M. y Gurumalles-Prabu, H. 2019. Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles from the aqueous leaf extract of *Dodonaea viscosa* with their antibacterial and anticancer activities. *Process Biochemistry*, 80: 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.014>
- Arfat, Y., Ahmed, J., Hiremath, N., Auras, R. y Joseph, A. 2017. Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 62: 191-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.009>
- Bahrami, A., Rezaei-Mokarram, R., Sowti-Khiabani, M., Ghanbarzadeh, B. y Salehi, R. 2019. Physico-mechanical and antimicrobial properties of tragacanth/hydroxypropyl methylcellulose/beeswax edible films reinforced with silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129: 1103-1112. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.045>
- Cano-Embuena, A., Cháfer-Nácher, MT., Chiralt, A. y González-Martínez, M.C. 2016. Development and characterization of active films based on starch-PVA, containing silver nanoparticles. *Food Packaging and Shelf Life*, 10: 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.07.002>
- Cardeno, L. y Londoño, M. 2014. Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*). *Soluciones de Postgrado EIA*, 12: 126-137. <https://doi.org/10.14508/sdp.2014.6.12.126-137>
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. y Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Emil, J. y Gautam, S. 2019. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*: 91-116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2>
- Erdogan, O., Muruvvet, A., Melike-Demirbolat, G., Birtokocak, F., Aksel, M., Pasa, S. y Cevik, O. 2019. Green synthesis of silver nanoparticles via *Cynara scolymus* leaf extracts: the characterization, anticancer potential with photodynamic therapy in MCF7 cells. *PLoS One*, 14(6), e0216496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216496>
- Femi-Adepoju, A.G., Oluwasogo-Dada, A., Opeyemi-Otun, K., Olufemi-Adepoju, A y Paul-Fatoba, O. 2019. Green synthesis of silver nanoparticles using terrestrial fern (*Gleichenia pectinata* (Willd.) C. Presl.): characterization and antimicrobial studies. *Heliyon*, 5(4), e01543. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01543>



- Gahruie, H., Mirzapour, A., Ghiasi, F., Eskandari, M., Moosavi-Nasab, M. y Hashem, S. 2022. Development and characterization of gelatin and Persian gum composite edible films through complex coacervation. *LWT- Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112422>
- Gavamukulya, Y., Maina, E., Meroka, A., Madivoli, E., El-Shemy, H., Wamunyokoli, F. y Magoma, G. 2020. Green Synthesis and Characterization of Highly Stable Silver Nanoparticles from Ethanolic Extracts of Fruits of *Annona muricata*. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30: 1231-1242. <https://doi.org/10.1007/s10904-019-01262-5>
- Jalab, J., Abdelwahed, W., Kitaz, A. y Al-Kayali, R. 2021. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Acacia cyanophylla* and its antibacterial activity. *Heliyon*, 7(9), <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08033>
- John, J., Aravindakumar, C.T. y Thomas, S. 2017. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Phyto-Constituents of *Ficus Auriculata Lour.* Leaf Extract: Mechanistic Approach, 4(1): 1-10.
- Ledezma, A., Romero, J., Hernández, M., Moggio, I., Arias, E., Padrón, G., Orozco, V., Martínez, A., Martínez, C. y Torres, S. 2014. Síntesis biomimética de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de nopal (*Opuntia* sp.) y su electrohilado polimérico. *Superficies y Vacío*, 27(4), 133-140.
- Madera-Santana, J., De Dios-Aguilar, M., Colín-Chávez, C., Mariscal-Amaro, L., Núñez-Colín, C., Veloz-García, R., Guzmán-Maldonado, S., Peña-Caballero, V., Grijalva-Verdugo, C. y Rodríguez-Núñez, J. 2019. Recubrimiento a base de quitosano y extracto acuoso de hoja de *Moringa oleifera* obtenido por UMAE y su efecto en las propiedades fisicoquímicas de fresa (*Fragaria x ananassa*). *Biotecnia*, 21(2). <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i2.941>
- Martinez, F., Zuñiga, E. y Lafarga, A. 2015. Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 6(10). <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2013.10.50967>
- Mohamed, S. A. A., El-Sakhawy, M. y El-Sakhawy, M. A.-M. 2020. Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review. *Carbohydrate Polymers*, 238: 116178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178>
- Nguyen, T., Dao, U., Bui, Q., Long, G., Thuc, C. y Thuc, H. 2020. Enhanced antimicrobial activities and physicochemical properties of edible film based on chitosan incorporated with *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. leaf extract. *Progress in Organic Coatings*, 140: 105487. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105487>
- Orsuwan, A., Shankar, S., Wang, L., Sothornvit, R. y Rhim, J. 2016. Preparation of antimicrobial agar/banana powder blend films reinforced with silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 60: 476-485. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.017>
- Osorio-Echavarría, J., Gómez-Vanegas, N., Osorio-Echeverría, J. y Ossa-Orozco, C. 2017. Obtención de biopelículas de carragenina suplementadas con nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente. *DYNA*, 84(201): 82-87. <https://doi.org/10.15446/dyna.v84n201.55702>
- Pérez-González, A. Módulo de elasticidad. [Consultado 26 Marzo 2022 ] 2014. Disponible en: [http://www.mecapedia.uji.es/modulo\\_de\\_elasticidad.htm](http://www.mecapedia.uji.es/modulo_de_elasticidad.htm)
- Poma, E., Requis, E., Gordillo, G. y Fuertes, C. 2011. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L (Guanábana) de Cuzco. *Ciencia e Investigación*, 14(2): 29-33. Retrieved from <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3168/2642>
- 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>
- Ruiz-Romero, P., Valdez-Salas, B., González-Mendoza, D. y Mendez-Trujillo, V. 2018. Antifungal Effects of Silver Phytonanoparticles from *Yucca shilerifera* Against Strawberry Soil-Borne Pathogens: *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina*. *Mycobiology*, 46 (1): 47-51. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454011>
- Salehi, F. 2020. Edible Coating of Fruits and Vegetables Using Natural Gums: A Review. *International Journal of Fruit Science*, 20(sup2): S570-S589. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1746730>
- Santhosh, S. B., Yuvarajan, R. y Natarajan, D. 2015. *Annona muricata* leaf extract-mediated silver nanoparticles synthesis and its larvicidal potential against dengue, malaria and filariasis vector. *Parasitology Research*, 114(8): 3087-3096. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4511-2>
- Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Standard test methods for water vapor transmission of materials ASTM E96/E96M-16. 2016. [www.astm.org](http://www.astm.org)
- Suput, D., Lazic, V., Popovoc, S. y Hromis, N. 2015. Edible films and coatings: Sources, properties and application. *Food and Feed Research*, 42(1): 11-22. <https://doi.org/10.5937/FFR15010115>
- Tamilarasi, P. y Meena, P. 2020. Green synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) using *Gomphrena globosa* (Globe amaranth) leaf extract and their characterization. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.04.025>
- Valdez-Salas, B., Beltrán-Partida, E., Mendez-Trujillo, V. y Gonzalez-Mendoza, D. 2020. Silver nanoparticles from *Hyptis suaveolens* and their effect on biochemical and physiological parameter in mesquite plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28: 101733. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101733>
- Vergara-Sotomayor, A., Páucar-Cuba, K., Morales-Comettant, C., Castro-Mandujano, O., Pizarro-Solís, P. y Díaz-Rosado, J. 2018. Obtención de extractos de hojas de *Annona muricata* L. (guanábana) inducidos por su efecto inhibidor de la corrosión. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84: 119-132. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v84i1.173>
- Xue, F., Gu, Y., Wang, Y., Li, C. y Adhikari, B. 2019. Encapsulation of essential oil in emulsion based edible films prepared by soy protein isolate-gum acacia conjugates. *Food Hydrocolloids*, 96: 178-189. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.014>
- Yamatoya, K., Tabuchi, A., Suzuki, Y. y Yamada, H. 2020. Chapter 20-Tamarind seed polysaccharide: Unique profile of properties and applications. *Biopolymer- Based Formulations*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00020-5>
- Zhao, D. y Shah, N. 2014. Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2): 454-462. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.029>

# Evaluación de películas comestibles de quitosano, agar y tomillo para mantener la calidad de frutos de aguacate 'Hass' durante su almacenamiento

Evaluation of edible chitosan, agar and thyme films to maintain the quality of 'Hass' avocado fruits during storage

Tomás J. Madera-Santana<sup>1</sup>, Víctor M. Toledo-López<sup>2</sup>, Karla Martínez-Robison<sup>1</sup>, Víctor Rejón-Moo<sup>3</sup>, Judith Fortiz-Hernández<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, 83304, México.

<sup>2</sup> Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Mérida.

<sup>3</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida, 97310 Mérida, Yucatán, México.

## RESUMEN

En este trabajo se elaboraron películas comestibles (PCs) a base de quitosano (Q), agar (A) y tomillo (T), en cuatro diferentes formulaciones (Q, A, QA y QAT). A las PCs se les evaluaron propiedades mecánicas (tensión y elongación a la ruptura), propiedades estructurales (espectroscopía de infrarrojo por FTIR), propiedades térmicas (análisis termogravimétrico), propiedades de transporte (permeabilidad al vapor de agua) y análisis morfológico (microscopía electrónica de barrido). Las PCs de QA y QAT destacaron por su resistencia a la tensión, transparencia, velocidad de transmisión al vapor de agua y permeancia, así como la mayor capacidad antioxidante. Se evaluó el efecto de la aplicación de los recubrimientos comestibles (RCs) de QA y QAT en la calidad de frutos de aguacate "Hass" durante 13 días de almacenamiento a 25 °C. Se evaluaron periódicamente en los frutos las variables de pérdida de peso, tasa de respiración, producción de etileno, apariencia visual y pudriciones. La aplicación de los RCs al fruto redujo su pérdida de peso y extendió su vida de anaquel. Los RCs les confirieron a los frutos una barrera al vapor de agua, reduciendo la pérdida de peso en 40%. Así mismo, se disminuyó la incidencia de pudriciones de los frutos.

**Palabras clave:** Recubrimientos comestibles, quitosano, tomillo, películas, vida de anaquel.

## ABSTRACT

In this work, edible films (PCs) based on chitosan (Q), agar (A) and thyme oil (T) were prepared in four different formulations (Q, A, QA and QAT), and their mechanical properties (tension and elongation at break) and water vapor permeability were evaluated. Infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and scanning electron microscopy (SEM) were also performed. The QA and QAT PCs stood out for their tensile strength, transparency, water vapor transmission rate and permeance, as well as the highest antioxidant activity. The effect of the application of the edible coatings (RCs) of QA and QAT on the quality of 'Hass' avocado fruit was evaluated during 13 d of storage at 25 °C. The following variables were evaluated periodically: weight loss, respiration rate, ethylene production, visual appearance,

and rotting. The application of RCs to the fruit reduced their weight loss and extended their shelf life. The RCs gave the fruit a barrier to water vapor, reducing weight loss by 40 with respect to the control. In addition, the incidence of fruit rots was reduced.

**Keyword:** Edible coatings, chitosan, thyme, films, shelf-life.

## INTRODUCCIÓN

México es el principal país productor de aguacate a nivel mundial, con un volumen de producción de 206,466 t en el ciclo 2019/2020 (SAGARPA, 2020), cubriendo una superficie de 241,140 ha. El principal cultivar es 'Hass', con el 89% de la producción. El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un fruto con excelente sabor y textura. Además, el aguacate es rico en vitamina E, ácido ascórbico, vitamina B<sub>6</sub>, β-caroteno y potasio (Arpaia, 2009); lo que lo convierte en un fruto con alto valor nutricional y sabor.

El aguacate es un fruto climatérico que madura después de cosechado y de alta tasa metabólica con una vida de anaquel corta, completando su madurez entre 5 a 7 días a 25 °C después de la cosecha (Kader y Arpaia, 1999). La aplicación de recubrimientos comestibles (RCs) o biodegradables es un método para extender la vida de almacenamiento del aguacate.

Las películas comestibles (PCs) son una capa fina que se puede utilizar como envase, las cuales al aplicarse sobre los alimentos de interés mediante la inmersión o aspersion forman los RCs; los componentes se formulan en solución como lípidos, proteínas, carbohidratos o mezclas de estos (Ramos-García *et al.*, 2010). Un recubrimiento comestible (RC) se puede definir como una matriz polimérica, que forma un recubrimiento alrededor del alimento y forma un mecanismo de barrera entre el fruto o vegetal y el ambiente. La aplicación de RCs permite alargar la vida útil durante el almacenamiento al reducir las pérdidas de humedad y retardar la maduración de los frutos, ya que actúan como barrera al intercambio gaseoso (Maftoonazed y Ramaswamy, 2005). Los RCs también se utilizan para mejorar la integridad o protección de los frutos frente a la manipulación y para aportar brillo a la fruta. Biopolímeros a base de almidón, quitosano,

alginato, agar, etc.; en forma de películas comestibles (PCs) o de RCs se han empleado como alternativa postcosecha de frutos, lo cual es una opción de envase primario ecológico y que no causa daño al medio ambiente por sus características de biodegradabilidad.

El agar (A) es un polisacárido extraído de las algas rojas (*Gracilaria*, *Gelidium* y *Pterocladia*), el cual se compone de residuos alternados de D- y L-galactosa, con enlaces  $\beta$ -1,3 and  $\alpha$ -1,4, respectivamente (Campa-Siqueiros *et al.*, 2020). Este biopolímero es biodegradable y biocompatible; además, posee la capacidad de producir películas; para ello, la adición de un plastificante es muy recomendable porque las películas de agar muestran alta resistencia mecánica, aunque con característica elástica (flexibilidad) limitada (Kanmani y Rhim, 2014).

Otro compuesto utilizado en los RCs es el quitosano (Q), el cual es un polisacárido lineal compuesto de glucosamina y unidades N-acetil-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4) glucosídico. Es obtenido por desacetilación alcalina de la quitina proveniente de crustáceos (Vargas *et al.*, 2006). Dependiendo del origen de extracción y las condiciones de extracción y desacetilación de la quitina, da como resultado el grado de acetilación y peso molecular del compuesto. La solubilidad, pK, viscosidad, capacidad de gelificación, entre otras propiedades depende de estos parámetros (Peniche *et al.*, 2008). El Q es biocompatible, biodegradable y es un material no tóxico. También tiene otras propiedades biológicas, como capacidad de cicatrizar heridas y actividad antimicrobiana. Buena capacidad de formar películas y puede ser procesada en fibras, geles, microesferas, microcápsulas y micro-nanopartículas (Santos-López *et al.*, 2017; Goycolea *et al.*, 2009). El Q es soluble en la mayoría de las soluciones de ácidos orgánicos (ácido acético, ácido láctico y ácido fórmico) (Badawi y Rabea, 2011). Una característica del Q es que presenta una actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias, mohos y levaduras. Diversos autores mencionan que su actividad antimicrobiana depende de varios factores, como es el peso molecular, grado de desacetilación, solubilidad, densidad de carga positiva, modificación química, pH, concentración, característica hidrofílica o hidrofóbica, capacidad quelante y tipo de microorganismo (Badawi y Rabea, 2011; Liu *et al.*, 2020).

Diversos estudios han reportado la aplicación de aceites esenciales o compuestos volátiles en los RCs, señalando que éstos dan buenos resultados en cuanto extender la vida de anaquel y mejorar la calidad de los frutos en postcosecha (Sellamuthu *et al.*, 2013; Al-Tayyar *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2022). Entre éstos se encuentra el aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*), el cual ha sido utilizado en RCs. Está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, borneol y linalol. Se ha reportado que el aceite esencial de tomillo es uno de los aceites esenciales con buenas propiedades antimicrobianas, siendo el timol y carvacrol los componentes más activos contra múltiples patógenos transmitidos por alimentos (Altiok *et al.*, 2010; Sellamuthu *et al.*, 2013). También se ha

publicado que este compuesto inhibe la germinación de esporas y el crecimiento y multiplicación celular de bacterias (López-Ambrocio *et al.*, 2016). Los RCs pueden ser un medio para la incorporación de compuestos antimicrobianos, como son ácidos orgánicos, aceites esenciales, ácidos grasos, extractos de semillas de plantas, enzimas y óxidos metálicos han sido usado con efectos antimicrobianos (Kanhamani y Rhim, 2014). Si bien los RCs de Q y aceites esenciales (*Thymus moroderi*, *Thymus piperella*, *cinnamon*, *clove*, etc.) han sido estudiados para su aplicación frutos frescos cortados y para el recubrimiento de éstos, permitiendo la inhibición de microorganismos y una alta actividad antioxidante. Sin embargo, no se tienen reportes en la literatura de la aplicación de un sistema basado en Q, A y T, para recubrimiento comestible de aguacate.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades mecánicas y físicas de PCs a base de mezclas de Agar (A), Quitosano-Agar (QA) y Quitosano-Agar-Tomillo (QAT). Se espera que el agar en combinación con quitosano y tomillo pueda mejorar las propiedades mecánicas de la película comestible y mejorar la adhesión de los RCs con los frutos de aguacate 'Hass' durante su almacenamiento a 25 °C, así como evaluar el efecto de los RCs en la calidad y vida de anaquel de los frutos, con la finalidad de reducir las pérdidas postcosecha.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

El quitosano (Q) de peso molecular medio y grado de acetilación  $\geq 75\%$  fue adquirido de Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO. USA). El agar (A) grado alimenticio se obtuvo de Agarmex, S.A. (Ensenada, BC. México). El aceite esencial de tomillo (T) grado alimenticio y de producción nacional, se obtuvo de Droguería Cosmopolita, S.A. (Ciudad de México). El material vegetal consistió en frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) 'Hass' adquiridos en el mercado local (Hermosillo, México), en estado de madurez fisiológica, con un color verde, tamaño uniforme, y libre de defectos. Los frutos se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) a 200 ppm; posteriormente, se secaron y se les aplicaron los recubrimientos.

### Preparación de soluciones y recubrimientos.

Se preparó la solución acuosa de A al 1 % w/v, se disolvieron 3 g en 300 mL de agua destilada a una temperatura de 60 °C y en agitación constante por 2 h. En una solución de ácido acético al 1 % se disolvió el Q al 1 % p/v. Se preparó una mezcla de 300 mL con las soluciones obtenidas con anterioridad de Q y A en una proporción 50:50 (QA). Además, se preparó una mezcla de QAT en las mismas proporciones de Q y A (50:50) y a esta solución se le adicionó el aceite de tomillo (1 % v/v).

Por el método de "casting" se prepararon las películas comestibles (PCs), con las soluciones preparadas de estas formulaciones (Q, A, QA y QAT). Las cuales se colocaron 80 mL de la solución en recipientes de plástico y se secaron en



una estufa hasta la evaporación total del solvente (por 24 h a 60 °C), y fueron mantenidas a 25 °C y 24 % de HR para su posterior evaluación.

### Caracterización de PCs

A las PCs obtenidas se les realizaron las siguientes determinaciones:

**Espesor.** El espesor de las diferentes formulaciones de PCs (Q, A, QA y QAT) se midió utilizando un micrómetro Digital Mitutoyo MDC-1<sup>SB</sup> (Mitutoyo, Japón) en tres zonas diferentes y se calculó el valor medio.

**Propiedades ópticas.** La transparencia de cada película (PC) se realizó por triplicado, utilizando un espectrofotómetro UV-visible Varian modelo Cary 50Bio (New London, USA) de acuerdo con el procedimiento descrito por Fang *et al.* (2002). El color de la superficie de la película comestible se determinó con un colorímetro Minolta modelo CR300 (Tokio, Japón). La escala utilizada fue la CIE-Lab y los parámetros medidos fueron: luminosidad ( $L^*$ ), los parámetros de color  $a^*$  (rojo a verde),  $b^*$  (amarillo a azul) y diferencia de color ( $\Delta E$ ).

**Propiedades mecánicas.** Las propiedades mecánicas de las diferentes películas formuladas se determinaron mediante el procedimiento de la norma ASTM D882-18, utilizando probetas de 7 x 1 cm<sup>2</sup>. El ensayo a la tensión se realizó en un texturómetro (Texture Technologies Corp., New York, USA), empleando una velocidad de cabezal de 10 mm/min y la distancia de separación de mordazas fue de 30 mm. Se determinaron tres parámetros mecánicos en el estudio: esfuerzo máximo, módulo de elasticidad y elongación a la ruptura.

**Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).** Se utilizaron muestras de las PCs de A, Q, QA, QAT con una dimensión de 1 x 1 cm<sup>2</sup>, espesor de 0.1 mm y se registraron los espectros de IR usando un espectrómetro FT-IR Thermo Scientific<sup>TM</sup> Nicolet iS-50 (Madison, WI. USA.), empleando la técnica reflectancia total atenuada (ATR-Attenuated Total Reflection). En el caso del aceite esencial de tomillo (T) este fue analizado en estado líquido. Los espectros se registraron de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup> con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, una velocidad de escaneo de 0.475 cm<sup>-1</sup>/s y 64 escaneos.

**Análisis termogravimétrico (TGA).** Las PCs fueron analizadas con el equipo TGA-8000 de Perkin Elmer (Boston, MA. USA). El rango de temperatura fue desde temperatura ambiente (25 °C) hasta 700 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de nitrógeno.

**Velocidad de transmisión del vapor de agua (VTVA) y la permeancia.** La velocidad de transmisión del vapor de agua (VTVA) y la permeancia al vapor de agua de las películas se realizó por triplicado, de acuerdo con el método reportado de la norma ASTM E96/E96M-16 (2016) con ligeras modificaciones.

**Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH.** Para la extracción de las películas, se siguió la metodología de Genskowsky *et al.* (2015), se pesó 0.2 g de película y se adicionó metanol para ser extraída en un sonicator Branson por 30 min para posteriormente ser cuantificada por el método de DPPH. La capacidad antioxidante se midió

siguiendo la metodología de Brand-Williams *et al.* (1995). La solución del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) se preparó disolviendo 2.5 mg del radical en 100 mL de metanol puro y se ajustó hasta obtener una absorbancia de la mezcla de  $0.7 \pm 0.02$ . Posteriormente, 20  $\mu$ L de extracto se mezclaron con 280  $\mu$ L de la solución del radical y después de un tiempo de incubación de 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad, se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de microplacas. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes Trolox por 100 g de película (mg ET/100 g) con base a una curva de calibración de Trolox (0.02 - 0.25 mg/mL).

### Aplicación de los recubrimientos a los frutos

Los frutos de aguacate seleccionados, lavados y secados se dividieron en tres lotes de 30 frutos cada uno, que corresponden a frutos Control (sin recubrimiento) y dos tratamientos de RCs (QA y QAT). Se colocaron en bandejas de plástico previamente desinfectadas. Después los frutos se recubrieron mediante inmersión en las soluciones de QA y QAT, se dejaron escurrir y secar por aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los frutos se almacenaron durante 13 d a 25 °C y 60 % de H.R., simulando el tiempo de comercialización.

### Evaluación de los frutos con recubrimiento comestible

**Pérdida de peso.** Se registró el peso inicial de cada fruto en una balanza digital Ohaus (Modelo Scout Pro, NJ, USA) y se realizó un seguimiento diario de esta variable durante el almacenamiento de los frutos. Los resultados se expresaron como el porcentaje del peso perdido. Esta variable se evaluó en 16 frutos por tratamiento.

**Tasa de respiración y producción de etileno.** En un sistema cerrado, se colocó el fruto en frascos de plástico (1.6 L), los cuales se cerraron herméticamente y se incubaron durante 30 min a una temperatura de 20 °C. Se tomó 1 mL de muestra de espacio de cabeza empleando una jeringa hipodérmica y se inyectó a un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 Cx acondicionado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna Hayasep N80/100 (2 m X 3.17 mm de diámetro interno, Supelco, Inc.) acoplado a un detector de conductividad térmica (para CO<sub>2</sub>) y un detector de ionización de flama (para Etileno). Las condiciones del equipo fueron: temperatura de inyección de 100 °C, temperatura de conductividad térmica de 170 °C y para el detector de ionización de flama de 120 °C. El área de la muestra se comparó con estándares conocidos y se calculó la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y etileno, que se reporta en mL CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y  $\mu$ L etileno kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Evaluación subjetiva de pudriciones.** Para la evaluación de pudriciones en la superficie del fruto se usó una escala subjetiva propuesta en el Manual Internacional de calidad de aguacate (Arpaia, 2009), que comprende valores de 0 a 1, donde 0 = sin pudrición (0 %) y 1 = con pudrición (> 0 %). La pudrición de la zona del pedúnculo se evaluó utilizando la misma escala subjetiva (Arpaia, 2009), que comprende valores de 0 a 3, donde 0 = sin daño, 1 = daño ligero (10 %),



1.5 (15 %), 2 = daño moderado (25 %) y 3 = daño severo ( $\leq 50$  %). Se usaron 15 frutos por tratamiento.

**Análisis estadístico.** Los datos se analizaron con el análisis de la varianza (ANOVA) con un diseño completamente al azar, para el caso de pérdida de peso, tasa de respiración y producción de etileno. Cuando hubo significancia, se efectuó comparación de medias por la prueba de rangos múltiples de Tukey, con un nivel de significancia de ( $p \leq 0.05$ ). Todos los datos fueron procesados en el programa NCCS-9 Statistical Software 2017 (Kaysville, UT. USA). Las pruebas mecánicas de las películas se analizaron con el programa Microcal Origin versión 8.0 de Microcal Software.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de las PCs

#### Propiedades ópticas

Con respecto a las propiedades ópticas, las mezclas de QA y QAT no mostraron diferencias significativas en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Comportamiento similar fue observado en el parámetro  $\Delta E$  con valores de 10.34 y 9.89, lo cual indica que la adición de Tomillo no cambió el color de las PCs (Tabla 1). La PC de A fue transparente, sin color, mientras que las películas de Q fueron menos transparentes, con ligera coloración amarilla. En lo que respecta a las PCs de QA y QAT, éstas no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los valores de  $L^*$ ,  $b^*$  y  $\Delta E^*$ . Respecto al  $\Delta E^*$ , las PCs presentaron valores de 8.3 a 10.42, presentando un valor mayor las PCs de Q, QA y QAT con valores de 10.42, 10.34 y 9.89, respectivamente, respecto a la PC de A.

La transparencia en la película de Q fue superior al de las otras tres películas (A, QA y QAT) que incluyeron agar en su formulación, se puede atribuir a que el agar es ligeramente opaco (Tabla 1).

La menor transparencia la presentó la PC de QAT lo cual puede deberse a que la adición de aceite de tomillo produjo que la PC tuviera poca opacidad. Esto coincide con lo reportado en algunas investigaciones, donde la adición de aceites esenciales a la matriz polimérica aumenta la opacidad de las mismas (Altiok *et al.*, 2010). Lo anterior se atribuye a la dispersión de las gotas de aceite en la matriz polimérica.

**Propiedades mecánicas.** En la Tabla 2 podemos observar los resultados de las pruebas mecánicas a tensión de las PCs de quitosano y sus formulaciones. Respecto al esfuerzo máximo, se puede señalar que las PCs de Q y QAT presentaron los valores mayores a 100 MPa ( $p < 0.05$ ). Similares resultados son reportados por Escárcega-Galaz *et al.*, (2018) para PC de

**Tabla 2.** Propiedades mecánicas de las películas comestibles formuladas\*.  
**Table 2.** Mechanical properties of the formulated edible films\*.

Tratamiento	Esfuerzo máximo (MPa)	Elongación a la ruptura (%)	Módulo de elasticidad (MPa)
Quitosano (Q)	100.6 $\pm$ 8.6 <sup>ab</sup>	5.12 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	3131.9 $\pm$ 152 <sup>b</sup>
Agar (A)	74.6 $\pm$ 8.1 <sup>a</sup>	6.42 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	2309.8 $\pm$ 153 <sup>a</sup>
QA	79.8 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>	5.22 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	3304.1 $\pm$ 164 <sup>b</sup>
QAT	119.7 $\pm$ 10.5 <sup>b</sup>	6.15 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	3522.8 $\pm$ 167 <sup>b</sup>

Donde A = Agar, Q = Quitosano, T = Tomillo. Media  $\pm$  desviación estándar; \*Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

quitosano puro con valores de 101 MPa, 4.73 % y 3834 MPa de esfuerzo máximo, elongación a la ruptura y módulo de elasticidad, respectivamente.

En la PC de QAT, la presencia del aceite de tomillo incrementó el esfuerzo máximo de la PC, aun cuando se trata de un aceite que se incorporó a la matriz de QA. Esto es particularmente importante, debido a que la incorporación de aceites esenciales conduce a la formación de películas de estructura heterogénea, con discontinuidades producidas por separación de fases que comúnmente se forman entre los componentes las PCs (Altiok *et al.*, 2010).

En lo que respecta a la elongación a la ruptura de las PCs formuladas, éstas no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) y presentaron valores en el rango de 5.1 a 6.4 %. Se ha reportado que las películas de Q suelen ser rígidas, inflexibles y quebradizas, por lo que es necesario mejorar sus propiedades con el uso de algún aditivo (Escárcega *et al.*, 2018). Algunos autores reportan una mejora en el % de elongación, con la adición de aceites esenciales de canela o de orégano en PCs a base de biopolímeros como carboximetil celulosa y quitosano. La adición de los aceites esenciales en PCs en cantidades mínimas pueden actuar en los sistemas como agentes plastificantes, debido a que disminuyen la fragilidad de la película causada por las fuerzas intermoleculares de los componentes (Bourtoom, 2008). Sin embargo, al incrementar el contenido de aceites esenciales o plastificantes, conduce a efectos de separación de fases (Madera-Santana *et al.*, 2011), entrecruzamiento por enlaces covalentes de la matriz biopolimérica y el aditivo (Noshirvani *et al.*, 2017). En este trabajo, la cantidad de aceite esencial de tomillo (1 %) permitió la elaboración de PCs basadas en Q y A con buenas propiedades mecánicas, sin separación de fases.

El módulo de elasticidad está relacionado con la rigidez de las películas. Se observa que las PCs que contie-

**Tabla 1.** Propiedades ópticas de las películas formuladas\*.

**Table 1.** Optical properties of the formulated films\*.

Tratamiento	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	Transparencia
A	89.01 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	-0.54 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	2.38 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	8.13 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.48 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>
Q	87.65 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	-1.36 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	5.78 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	10.42 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	1.98 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
QA	87.60 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	-1.40 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.62 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	10.34 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.56 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
QAT	87.62 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	-1.22 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	5.11 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	9.89 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>

Donde A = Agar, Q = Quitosano, T = Tomillo. Media  $\pm$  desviación estándar; \*Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

nen Q se caracterizan por presentar los valores mayores de módulo elástico, los cuales son superiores a los registrados en la película de A ( $p < 0.05$ ). La película QAT posee el mayor valor promedio de módulo de elasticidad, en comparación a las PCs formuladas, lo cual indica que la mezcla de los componentes de esta película presenta una sinergia que indica buena cohesión, sin separación de fases, pero reduce en cierto grado la flexibilidad de la película. Sin embargo, dada la aplicación que se les pretende dar a las PCs como es de recubrimientos de frutas y vegetales la formulación de QAT presentó buenas propiedades mecánicas en comparación a las demás formulaciones, ya que presentó mayores valores de esfuerzo máximo y elongación a la ruptura. Es importante señalar que la elongación es la deformación del material, y se considera que es un factor en la selección de las PCs, porque representa la capacidad que posee la película para absorber y disipar el esfuerzo mecánico al que es sometida (Madera-Santana *et al.*, 2011).

**Velocidad de transmisión al vapor de agua (VTVA) y permeancia.** La VTVA de las PCs de QAT presentó mayores valores ( $p < 0.05$ ), en comparación con las demás PCs (Tabla 3). Estos resultados coinciden con lo reportado por Altiok *et al.* (2010), quienes observaron un aumento de la VTVA de las PC de Q con la adición de aceite de tomillo, atribuyendo dicho incremento a la formación de estructuras de poros con la adición de aceite de tomillo, como se observó en las micrografías de MEB. Respecto a las PCs de A, Q y QA, mantuvieron similares valores de VTVA.

Respecto a la permeancia, la PC de QAT presentó el mayor valor de permeancia ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3), lo cual nos indica que la adición de aceite de tomillo aumenta en 14.2 % el transporte del vapor de agua, en comparación con la PC de QA.

### Capacidad antioxidante (DPPH)

En el presente estudio se encontró mayor capacidad antioxidante en la PC de QAT, seguidas de las PCs de QA y Q (Tabla 3). Algunos componentes de los aceites esenciales como el timol y carvacrol son compuestos aromáticos, bioactivos y presentan cierta actividad antioxidante.

Se ha reportado actividad antioxidante del quitosano y sus derivados (Kumar *et al.*, 2020); así mismo, se ha reportado que los RCs a base de quitosano pueden reducir el estrés oxidativo, reduciendo la producción de ROS (Especies

Reactivas al Oxígeno) a través de un aumento del sistema de defensa antioxidante. Por ejemplo, frutos de nísperos "loquat" con RC a base de quitosano/nano-sílica tuvo una reducción de alrededor 35 % y 69 % en el contenido de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , respectivamente (Adiletta *et al.*, 2021). Los RCs de QAT presentaron mayor actividad antioxidante, lo cual nos indica que puede evitar el deterioro de la integridad celular y mejorar el sistema de defensa del fruto.

Kumar *et al.* (2020) reportan que hay una mayor capacidad antioxidante al incorporar aceite de tomillo a las PC de Q, debido principalmente a los compuestos como el timol y carvacrol.

### Espectrometría de infrarrojo (FTIR)

Los espectros de IR de las PCs de Q se presentan en la Figura 1, donde se pueden observar los espectros de los grupos funcionales del Q. El Q es un copolímero aleatorio derivado de la desacetilación alcalina de la quitina, cuyos componentes han mostrado las bandas características entre 3300 y 3200  $cm^{-1}$ , que corresponden al estiramiento del grupo hidroxilo (O-H), así como al estiramiento asimétrico y simétrico de enlaces N-H en el grupo amino secundario. La región comprendida entre 2930 a 2870  $cm^{-1}$  se observan dos bandas de absorción moderada, que corresponden a las vibraciones de tensión (C-H) de los grupos  $-CH_2-$ . Jakuboswka *et al.* (2020) mencionan que en los espectros las bandas a 1631 y 1021  $cm^{-1}$  se atribuyen a la vibración de estiramiento de C=O en las amidas (p. ej. banda amida I), mientras que la banda presente a 1540  $cm^{-1}$  corresponde al doblamiento del enlace N-H en la amida y grupo amino protonado (p. ej.  $-(NH_2)$ , banda amida amida II). En este estudio la banda de amida I y el estiramiento del grupo C=O se observó a 1650  $cm^{-1}$ , mientras que a 1550  $cm^{-1}$  se observaron las señales de amida II y el doblamiento del enlace N-H, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Rinaudo, 2006; Martínez-Robinson *et al.*, 2022). Estas bandas representan la estructura de N-acetil glucosamina, el cual puede ser encontrado en quitosano puro con bajo grado de desacetilación (Escárcega *et al.*, 2018).

En la Figura 1 se presenta el espectro del agar (A). Kanmani y Rhim (2014) reportaron el espectro de agar, con bandas características en la región de 3354  $cm^{-1}$  a 771  $cm^{-1}$ . La banda característica de absorción a 3354  $cm^{-1}$  indica estiramiento de grupos hidroxilo (OH), mientras que la ubicada a 2925  $cm^{-1}$  es atribuida al estiramiento de CH, el cual es asociado con un anillo de la galactosa con átomos de metil-hidrógeno. La banda a 1642  $cm^{-1}$  es debido al estiramiento de la vibración de los péptidos conjugados formado por amida (NH) y grupo acetona.

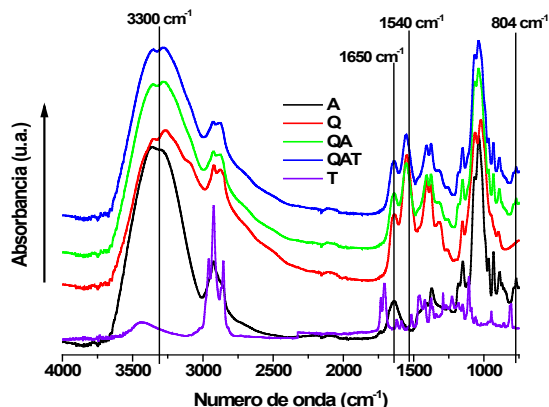
Después de mezclar a los dos biopolímeros, es posible comparar si una mezcla física de los componentes presenta alguna interacción química, mediante el análisis de las bandas características de los componentes en el espectro FTIR. Estas bandas pueden resultar en la aparición de nuevas o cambios en las bandas existentes (Madera-Santana *et al.*, 2011). Respecto a las mezclas de QA y QAT, los espectros de absorción son muy similares. Esto indica que la incorporación

**Tabla 3.** Valores de VTVA, permeancia y actividad antioxidante (DPPH) de las películas formuladas\*.

**Table 3.** WVTR, permeance and DPPH values of the formulated films\*.

Tratamiento	VTVA (g/m <sup>2</sup> h)	Permeancia (g/m <sup>2</sup> h mm Hg)	DPPH (mg ET/100 g)
A	42.57 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.52 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.071 ± 0.022 <sup>a</sup>
Q	44.95 ± 2.66 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.02 <sup>ab</sup>	1.16 ± 0.067 <sup>b</sup>
QA	43.34 ± 3.9 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.022 <sup>b</sup>
QAT	48.19 ± 2.8 <sup>b</sup>	2.81 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.73 ± 0.043 <sup>c</sup>

Donde A = Agar, Q = Quitosano, T = Tomillo. \*Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



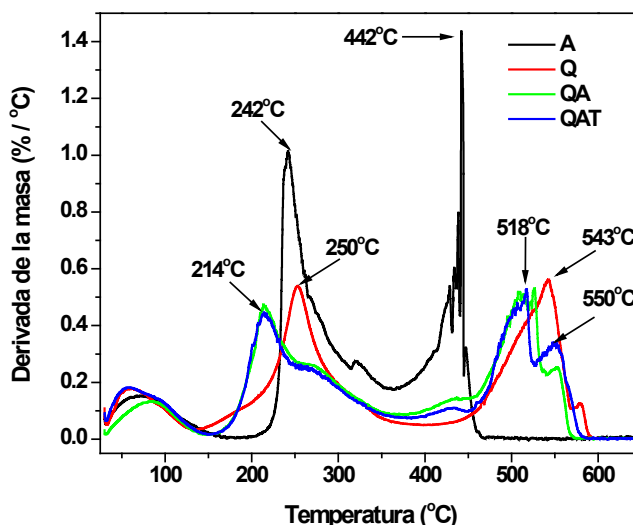
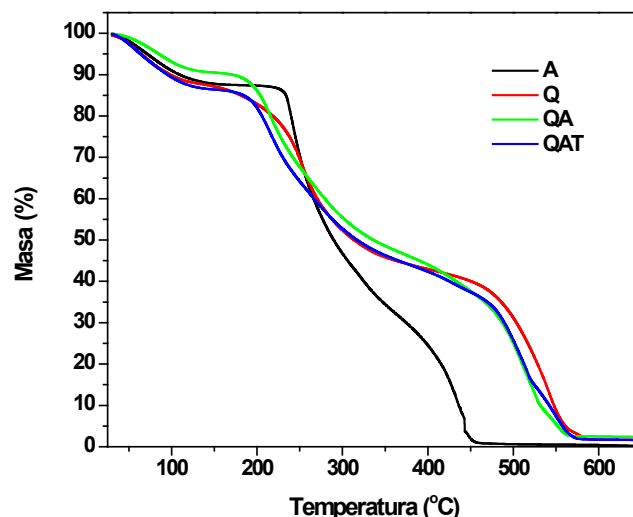
**Figura 1.** Espectros de infrarrojo de PCs de quitosano (Q), agar (A), quitosano-agar (QA), quitosano-agar-tomillo (QAT) y aceite de tomillo.

**Figure 1.** FTIR spectra of chitosan films (Q), agar (A), chitosan-agar (QA), and chitosan-agar-thyme (QAT).

de aceite de tomillo a la mezcla QA no presentó cambios estructurales en la PC, por lo que no se observaron cambios en la intensidad de las bandas y en el número de onda. Altiok *et al.* (2010) reportan en el espectro ATR-IR de aceite de tomillo una banda del anillo de vibración de timol y carvacrol a 804 y 811  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. En el espectro del presente estudio, solo la banda característica del carvacrol fue observada a 813  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual es una evidencia de la presencia de este compuesto en el aceite de tomillo.

### Análisis termogravimétrico (TGA)

En el análisis termogravimétrico de las películas de QA y QAT, la descomposición se presenta en tres etapas (Figura 2). La primera descomposición corresponde a la liberación del agua libre (5.5 a 10 %) o humedad ( $> 100$  °C), la incorporación de aceite de tomillo no afecta la evaporación del agua. La segunda descomposición se presenta con una inflexión más prolongada, que corresponde a la descomposición de los biopolímeros en el intervalo de 185 - 310 °C y una tercera y última descomposición, entre 395 - 585 °C. Esto coincide con Balau *et al.* (2004) reportan que las PC de Q se descomponen en 2 etapas, la primera inicia a 180 °C y termina cerca de 300 °C, con un máximo descomposición de alrededor de los 255 °C. Esta descomposición se atribuye a un proceso que incluye la deshidratación, depolimerización y descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas de los polímeros. La última descomposición inicia a los 540 °C y probablemente se deba a los procesos termo-oxidativos (Balau *et al.*, 2004). Kanmani y Rhim (2014) reportaron que las películas de A mostraron un segundo pico de degradación menos prolongado entre 220 - 250 °C. Además, se han reportado tres etapas en la degradación térmica del agar. Estas etapas de degradación térmica se observan a 90, 250 y 325 °C. La primera degradación fue principalmente atribuida a la evaporación del remanente de agua. La segunda y tercera etapa es la degradación que puede ser debida a la descomposición del glicerol (plastificante) y del biopolímero de agar, respectivamente (Rhim *et al.*, 2006). Similarmente,



**Figura 2.** Termogramas termogravimétricos (a) y derivada del análisis termogravimétrico (DTG) (b) para las PCs de quitosano (Q), agar (A), quitosano-agar (QA) y quitosano-agar-tomillo (QAT).

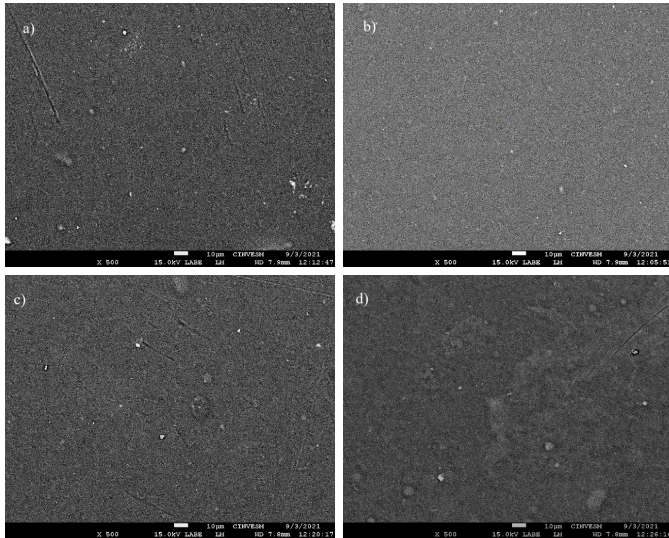
**Figure 2.** Thermogravimetric thermograms (a) and derivative thermogravimetric analysis (DTG) (b) for chitosan (Q), Agar (A), chitosan-agar (QA), and chitosan-agar-thyme (QAT) films.

Campa-Siqueiros *et al.* (2020) reportó la descomposición térmica de PC basadas en A, la cual presenta una primera descomposición térmica alrededor de los 260 °C y una segunda a 452 °C. Altiok *et al.* (2010) mencionan que la primera descomposición corresponde al efecto endotérmico atribuida a la evaporación de los solventes (ácido acético, etanol, agua) usada en la preparación de PC de Q. Mientras el efecto exotérmico ocurre a alta temperatura, la cual es atribuida a la descomposición del polímero. Si bien, el A y el Q tienen temperaturas de descomposición diferentes en las dos etapas, es importante señalar que los termogramas de las PC de Q, QA y QAT, estos fueron muy similares. Lo anterior, nos permite aseverar que los componentes tienen una buena miscibilidad, ya la temperatura de descomposición se encuentra entre sus componentes puros (Q y A).



### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología superficial de las PCs se muestra en la Figura 3. En la PC de A (Figura 3a) y la Q (Figura 3b) se observa que ambas películas presentan uniformidad en la superficie, la cual presenta una superficie lisa y sin poros. La PC de QA (Figura 3c) presenta una superficie homogénea, lo cual indica que tanto el Q como el A se mezclaron homogéneamente a nivel de microdominios, ya que no se ven evidencias de separación de fases. No obstante, se observan algunas irregularidades, como son los poros en la superficie, los cuales se atribuyen a la evaporación del solvente de la película. La adición de aceite de tomillo a la PC de QAT produjo modificaciones en la superficie, como son el aumento de la rugosidad y opacidad (Figura 3d). En la superficie de esta PC se observaban más poros, en comparación de QA; esto se puede deber a la presencia de pequeñas burbujas con la adición de aceite de tomillo. Los poros se pueden deber a la evaporación del solvente del quitosano (ácido acético) que posee una menor presión de vapor, en comparación con la del agua. Sin embargo, las PCs muestran cierto grado de uniformidad, por lo cual hace posible su uso como recubrimiento de alimentos.

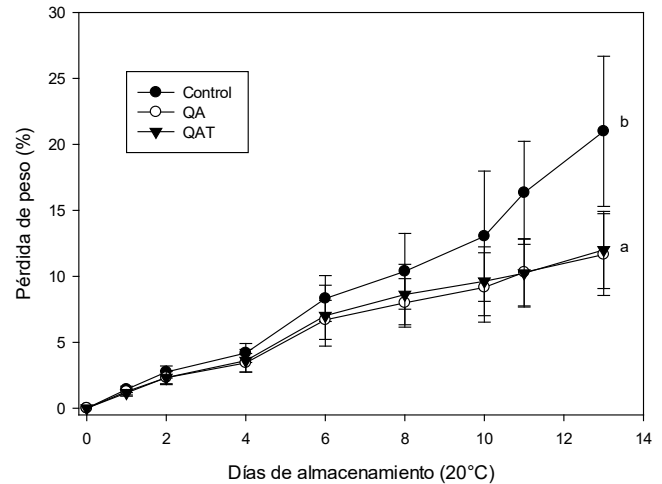


**Figura 3.** Morfología de la superficie de las películas formuladas a una magnificación de 500x: agar (a), Quitosano (b), QA (c) y QAT (d).

**Figure 3.** Surface morphology of formulated films at 500 x magnification: agar (a), chitosan (b), chitosan-agar (c), and chitosan-agar-thyme (d).

### Aplicación de los recubrimientos y almacenamiento Pérdida de peso, tasa de respiración y producción de etileno de frutos de aguacate

La pérdida de peso fue aumentando gradualmente durante el almacenamiento; a partir del día 7 se observó que los frutos control presentaron valores mayores ( $p < 0.05$ ) respecto a los frutos recubiertos. Los RCs de QA y QAT redujeron un 40 % de pérdida de peso después de 13 días a 25 °C de almacenamiento, en comparación al Control (Figura 4). Estas diferencias significativas de pérdida de peso se atribuyen a que los RCs forman una barrera en la superficie del fruto que reduce la pérdida de agua por transpiración y, por lo tanto, pérdida de agua; además, limitan el intercambio de gases de  $O_2$  y  $CO_2$  (Aguilar-Méndez *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Cambios en la pérdida de peso en frutos de aguacate con recubrimientos comestibles de QA y QAT, almacenados por 13 d a 25 °C.

**Figure 4.** Changes in avocado fruits weight loss with QA and QAT edible coating stored for 13 d at 25 °C.

Respecto a la tasa de respiración, los aguacates Control y con RCs presentaron una disminución de la tasa de respiración durante su almacenamiento al décimo día a 25 °C (Figura 5), sin presentar diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Con excepción de los frutos QAT, los cuales presentaron un pico de producción al día 2 de almacenamiento, con un valor de 165 mL  $CO_2$   $kg^{-1} h^{-1}$ . Estos resultados coinciden con otros estudios en frutos de aguacate con RCs, donde reportan valores máximos de la tasa de respiración de 145 y 157 mL  $CO_2$   $kg^{-1} h^{-1}$  (después de 6 días a 20 °C), para frutos encerados y frutos control, respectivamente (Meir *et al.*, 1997).

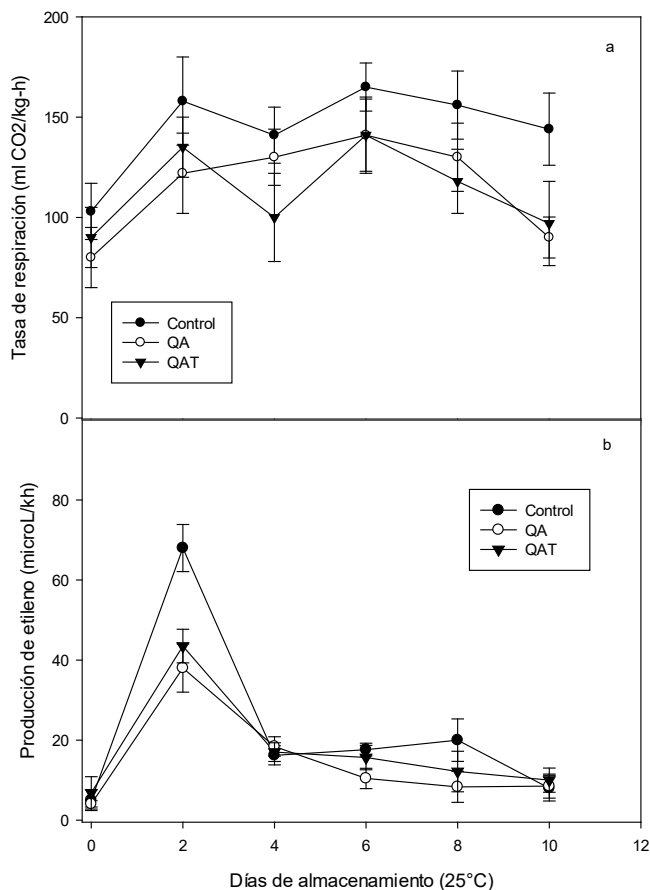
La producción de etileno disminuyó durante el almacenamiento a 25 °C por 10 d, no observándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los frutos control y con los RCs. La producción de etileno presentó un máximo al día 2, con valores de 82, 34 y 46  $\mu L$   $kg^{-1} h^{-1}$  para el Control, QA y QAT, respectivamente para después disminuir sus valores.

En un fruto climatérico como el aguacate, el incremento en la tasa de respiración es el detonante para la elevación de etileno y cambios bioquímicos, como son la síntesis de carotenoides, degradación de clorofilas y carbohidratos, y la síntesis de ácidos grasos insaturados (Villa-Rodríguez *et al.*, 2011).

### Incidencia de pudriciones

En lo que respecta a la incidencia de pudriciones, al día 6 de almacenamiento se observó la aparición de hongos en los frutos control (valor de 0.5, muy ligero). En contraste, los frutos con RCs de Q y QAT presentaron menor incidencia de pudriciones (Tabla 4). Para el día 13 de almacenamiento, los frutos Control mostraron un aumento significativo en la presencia de hongos con un valor de 2.1 (más del 25 %), mientras que los tratamientos con RCs QA y QAT presentaron menor incidencia de hongos, aunque en menor proporción,





**Figura 5.** Cambios en la tasa de respiración (a) y producción de etileno (b) en frutos de aguacate con recubrimientos de QA y QAT almacenados por 13 d a 25 °C.

**Figure 5.** Changes in respiration rate (A) and ethylene production (B) of avocado fruits with QA and QAT edible coating stored for 10 d at 25 °C.

**Tabla 4.** Cambios de pudrición por hongos y pudrición de pedúnculo de aguacate 'Hass' recubiertos con QA y QAT almacenados por 13 d a 25 °C.

**Table 4.** Changes on the incidence and stem end rot of avocado fruit 'Hass' coated with QA and QAT stored for 13 d at 25 °C.

Pudrición por hongos			
Día	Control	QA	QAT
0	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
6	0.5 ± 0.52 <sup>ab</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.38 <sup>a</sup>
13	2.1 ± 1 <sup>c</sup>	0.92 ± 1.00 <sup>b</sup>	0.75 ± 1.17 <sup>b</sup>
Pudrición de pedúnculo			
Día	Control	QA	QAT
0	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
6	0.75 ± 1.5 <sup>ab</sup>	0.37 ± 0.75 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
13	2.5 ± 1 <sup>c</sup>	0.72 ± 1.00 <sup>b</sup>	0.55 ± 1.17 <sup>b</sup>

Donde 0 = sin daño, 1 = daño ligero (10%), 1.5 (15%), 2 = daño moderado (25%) y 3 = daño severo (≤ 50%). \*Es el promedio de la evaluación subjetiva de 15 frutos por tratamiento. \*Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

con valores de 0.92 y 0.75 (daño ligero en el fruto). De acuerdo con los resultados, la aplicación de RCs nos indica que se inhibió significativamente el crecimiento de hongos en los frutos de aguacate, aunque no inhibió completamente la aparición de pudriciones. Esto coincide con lo reportado por otros autores, quienes mencionan una reducción de incidencia de pudriciones con RC de Q. Martínez-Camacho *et al.* (2010) evaluaron el crecimiento radial de colonias de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con quitosano, donde se encontró que el Q tuvo un efecto fungistático al inhibir el crecimiento del hongo, pero no lo inhibió al 100 %, y no un efecto fungicida. Resultados similares fueron obtenidos del Q y sus derivados al inhibir el crecimiento de hongos como *B. cinérea*, *Fusarium oxysporum*.

Esto se atribuye a diversos mecanismos de acción de Q propuestos, como es la modificación de la pared celular de los hongos, reduciendo su capacidad de regeneración de la pared celular del microorganismo, provocando su muerte. Se ha reportado en varios trabajos la actividad antimicrobiana del quitosano (El Ghaouth *et al.*, 1992; Rodríguez-Núñez *et al.*, 2014), donde se ha observado una reducción en el crecimiento micelar de varios microorganismos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* a una concentración de quitosano (750-6000 mg/L) (Badawy y Rabea, 2011).

En lo que respecta a la pudrición del pedúnculo se tuvo un comportamiento muy similar, donde al día 6 se empezaron a presentar la incidencia de pudriciones (Tabla 4). Los frutos con los RCs presentaron menor desarrollo de pudriciones. Los frutos con RC de QAT no presentaron incidencias de pudriciones de pedúnculo al día 6 de almacenamiento hasta el día 10; esto se atribuye a la actividad antimicrobiana del quitosano y aceite de tomillo. La pudrición peduncular del aguacate se presenta en postcosecha, es un factor que limita su comercialización y exportación. Las restricciones del uso de fungicidas convencionales limitan su uso, por lo cual la aplicación de compuestos como el Q se pudiera utilizar en el control de esta pudrición.

Por otra parte, el modo de acción del aceite de tomillo pudiera estar relacionada con la presencia de compuestos como el timol y carvacrol, y a su actividad antimicrobiana. Sellamuthu *et al.* (2013) reportaron que empaques en atmósferas modificadas (MAP, 8 % CO<sub>2</sub> y 2 % O<sub>2</sub>) + aceite de tomillo redujeron la incidencia del hongo que causa la antracnosis; así mismo, reduciendo la pérdida de peso y firmeza después de 18 d de almacenamiento a 10 °C más 10 d a 25 °C en frutos de aguacate 'Hass'.

## CONCLUSIONES

Por medio de la técnica solución-vaciado, se fabricaron PCs de Q, A, QA y QAT, las cuales fueron transparentes, homogéneas y uniformes en color, aunque con una ligera coloración amarilla. Además, en los resultados de las pruebas mecánicas a tensión de las PCs, se observó que las películas

de QA y QAT presentaron valores más altos de esfuerzo máximo y módulo de elasticidad, pero una baja flexibilidad. Las PCs de QA y QAT destacaron por su resistencia a la tensión, transparencia, velocidad de transmisión al vapor de agua y permeancia, así como la mayor capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos de la permeabilidad al vapor indican que las mezclas QA y QAT son aptas para aplicarse en forma de RCs.

Los RCs aplicados a los frutos disminuyeron la pérdida de peso en casi un 40% en comparación con los frutos control. La aplicación de los RC a base de QA y QAT contribuyeron positivamente a mantener la calidad e inhibir la pudrición de los frutos y pudrición peduncular de frutos aguacate 'Hass'. Los RCs QAT tuvieron un mayor efecto fungistático en el control del desarrollo de algunos hongos en postcosecha, reduciendo la incidencia de pudriciones del pedúnculo durante el almacenamiento a 25 °C después de 13 días de almacenamiento y permitieron conservar la apariencia de los frutos durante el almacenamiento a 25 °C. Por lo cual la aplicación de RC compuestos con el Q y aceite de tomillo en frutos de aguacate se pudiera utilizar en el control de pudriciones.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Méndez, M., San Martín-Martínez, E., Cruz-Orea, T. y Jaime-Fonseca, M. 2008. Gelatine starch films: Physicochemical properties and their application in extending the postharvest shelf life of avocado (*Persea americana*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88(2):185-193. doi:10.1002/jsfa.3068.
- Arpaia, M. 2009. Manual internacional de la calidad del aguacate. Pub. 25. Postharvest Technology Center. University of California, Davis CA. <http://postharvest.ucdavis.edu>.
- Adiletta G., Di Mateo M. y Petriccione, M. 2021. Multifunctional role of chitosan edible coating on antioxidant systems in fruit crops: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 22:2633. doi:10.3390/ijms22052633.
- Al-Tayyar N.A., Youssef A.M. y Al-Hindi R.R. 2020. Edible coating and antimicrobial nanoemulsions for enhancing shelf life and reducing food borne pathogens of fruits and vegetables a review. *Sustainable Materials and Technologies* 40,20 p.e00215.
- Altioek D., Altioek E. y Tihminlioglu, F. 2010. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21:2227-2236. doi:10.1007/s10856-010-4065-x.
- Badawy, E.M. y Rabea I. 2011. A biopolymer chitosan and its derivatives promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrates Chemistry*. Vol. 29:460381. doi:10.1155/2011/460381.
- Balau L., Lisa G., Popa M.I., Tura V. y Melnig V. 2004. Physico-chemical properties of chitosan films. *Central European Journal of Chemistry* 2(4), 638-647. doi:10.2478/BF02482727.
- Bourtoom, T. 2008. Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starch-chitosan. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30 (Suppl.1):149-165.
- Brand-Williams, W., Cuvelier M.E. y Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidants activity. *LWT-Food Sciences and Technology* 28(1):25-30. doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Campa-Siqueiros P., Vargas-Aispuro I., Quintana-Owen P., Freile-Pelegrin Y., Azamar-Barrios J. y Madera-Santana, T. 2020. Physicochemical and transport-properties of biodegradable agar films impregnated with natural semichemical based on hydroalcoholic garlic extract. *International Journal of Biological Macromolecules* 151:27-35. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.158.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A. y Benhamou, N. 1992. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*. 96(9): 769-779.
- Escárcega-Galaz, A., Sánchez-Machado, D., López-Cervantes, J., Sánchez-Silva, A., Madera-Santana, T. y Paiseiro-Losada, P. 2018. Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* 116:472-481. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149
- Fang, Y., Tung, M., Britt, I., Yada, S. y Dalgleish, D. 2002. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. *JFS: Food Engineering and Physical Properties*. 67, 188-193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11381.x>.
- Genskowsky E., Puente L.A., Pérez-Alvarez J.A., Fernández-López J., Muñoz L.A. y Viuda-Martos, M. 2015. Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry. *Food Science and Technology* 64:1057-1062. doi:10.1016/j.lwt.2015.07.026
- Goycoolea, F., Remuñan-López, C. y Alonso, M. J., 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Monogr. Real Acad. Nac. Farm.* 2009, 103-131.
- Jakuboswka E., Gierszewska M., Nowaczyk J. y Olewnik-Kruszkowska, E. 2020. Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvent. *Food Hydrocolloids* 108:106007. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106007.
- Pandey V.K., Ul Islam R., Shams R. y Hussain A.D. 2022. A comprehensive review on the application of essential oils as bioactive compounds in nanoemulsion based edible coating of fruits and vegetables. *Applied Food Research* 2(1):100042. doi.org/10.1016/j.afres.2022.100042.
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W. y Goycoolea, F.M., 2008. Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications, in: Belgacem, M.N., Gandini, A. (Eds.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier, Amsterdam, pp. 517-542. doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00025-9
- Liu, Y, Yuan, Y., Duan, S., Li, G. y Liu, B. 2020. Preparation and characterization of chitosan films with three kinds of molecular weight for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules* 155:249-259. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.217
- López-Ambrocio, M.N., Ruiz-Posadas, L.M. y Delgadillo-Martínez. 2016. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L). *Agroproductividad* 9(11):78-82.
- Kader, A.A. y Arpaia, M.L. 1999. Avocado, *Produce Facts*. Postharvest Technology Center. University of California, Davis. [http://postharvest.ucdavis.edu/produce\\_facts/fruits/avocado.html](http://postharvest.ucdavis.edu/produce_facts/fruits/avocado.html).

- Kanmani, P. y Rhim, J. 2014. Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers* 102:708-716. doi:10.1016/j.carbpol.2013.10.099
- Kumar S., Mukherjee A. y Dutta, J. 2020. Chitosan based nanocomposite films and coating: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science and Technology* 97:196-209. doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.002
- Madera-Santana, T., Robledo, D. y Freile-Pelegrin, Y. 2011. Physicochemical properties of biodegradable polyvinyl alcohol-agar films from the red algae *Hydropuntia corneri*. *Marine Biotechnology* 13:793-800. doi 10.1007/s10126-010-9341-8
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerra-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., Yépiz-Gómez, M. S., y Plascencia-Jatomea M. 2010. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 305-315. doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.069
- Martínez-Robinson, K.G., Martínez-Inzunza, A., Córdova, R.J.R., Rochín-Wong, S., Vasquez-García, S.R. y Fernández-Quiroz, D. 2022. Physicochemical study of chitin and chitosan obtained from California brown shrimp (*Farfantepenaeus californiensis*) exoskeleton. *Biotecnia* 24, 28-35. doi.org/10.18633/biotecnia.v24i2.1616
- Maftoonazad, N. y Ramaswamy, H. 2005. Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT:Food Science and Technology* 38:617-624. doi:10.1016/j.lwt.2004.08.007
- Meir S., Naiman D., Akerman M., Hyman J., Zauberman G. y Fuchs, Y. 1997. Prolonged storage of "Hass" avocado fruit using modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology* 12(1):51-60. doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00038-0
- Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Gardrat, C., Reza, M., Hashemi, M., Le Coz, C. y Coma, V. 2017. Cinnamon and ginger essential oil to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. *Food Hydrocolloids* 70:36-45. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.015
- Ramos-García, M., Bautista-Baños, S. y Barrera-Necha, L. 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 28, 44-57. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61214206005.
- Rhim J.W., Hong S.I., Park H.M. y Ng, P. 2006. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(16):5814-5822. doi:10.1021/jf060658h
- Rinaudo M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymers Science* 31:603-632.
- Rodríguez-Nuñez J.R., Madera-Santana T., Sanchez-Machada D., Lopez-Cervantes J. y Soto-Valdez, H. 2014. Chitosan/Hydrophilic plasticizer-based films: preparation, physicochemical and antimicrobial properties. *Journal of Polymers and Environment* 22(1):41-51. doi 10.1007/s10924-013-0621-z
- Santos-Lopez G., Arguelles-Monal W., Carvajal-Millan E., Lopez-Franco Y., Recillas-Mota M. y Lizardi-Mendoza J. 2017. Aerogels from chitosan solutions in ionic liquids. *Polymers* 9,722. doi:10.3390/polym9120722
- Sellamuthu, P.S., Mafune, M., Sivakumar, P. y Sounndy, D. 2013. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocados. *Journal of the Science of Food Agriculture* 93:3024-3031. doi 10.1002/jsfa.6135
- Vargas, M., Albors, A., Chrrait, A. y Gonzalez, C. 2006. Quality of cold-stores strawberries as affected by chitosan oleic acid edible coating. *Postharvest Biology and Technology* 41(2):164-171. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.03.016
- Villa-Rodríguez, J.A., Molina-Corral, F.J., Ayala-Zavala, F. y González-Aguilar, G. 2011. Effect of maturity stage on the content of fatty acid and antioxidant activity of "Hass" avocado. *Food Research International* 44(5):1231-1237. doi:10.1016/j.foodres.2010.11.012

## Proposal for a metabolic syndrome model in CD1 mice induced with a hypercaloric diet

Propuesta de un modelo de síndrome metabólico en ratones CD1 inducido con una dieta hipercalórica

Xóchitl Cruz Sollano-Mendieta<sup>1</sup>, Gerardo Norberto Escalona-Cardoso<sup>1</sup>, Edgar Cano-Europa<sup>2</sup>, Norma Paniagua-Castro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Farmacología del Desarrollo,

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

### ABSTRACT

Metabolic diseases, including obesity and type 2 diabetes mellitus, represent a serious health and death problem in Mexico. The World Health Organization (WHO) and other associations such as the International Diabetes Federation (IDF) and the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) define the Metabolic Syndrome (MetS), as the set of metabolic alterations that lead to the development of obesity, hypertension, and diabetes mellitus. The objective of this study was to develop a model of MetS in CD1 rodents using a hypercaloric diet and to determine the advantages and / or disadvantages compared to other murine models. Female and male CD1 mice were divided into 2 groups by gender, a control group, and another group with a hypercaloric diet for 10 weeks. The results obtained showed that the hypercaloric diet is efficient to develop the metabolic alterations present in MetS, better results were observed in male mice, which is why the use in this genus is suggested to avoid the hormonal changes present in adult females.

### RESUMEN

Las enfermedades metabólicas, incluyendo la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, representan un grave problema de salud y mortalidad, en México. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y otras asociaciones como la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) y el Programa Nacional de Educación para el Colesterol-Panel de Tratamiento para el Adulto III (NCEP-ATP III) definen el Síndrome Metabólico (SM), como la agrupación de alteraciones metabólicas que conllevan al desarrollo de obesidad, hipertensión y diabetes mellitus. El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo de SM en roedores CD1 utilizando una dieta hipercalórica y determinar las ventajas y/o desventajas comparado con otros modelos murinos. Se utilizaron ratones CD1 hembras y machos se dividieron en 2 grupos por género, un grupo control y otro grupo con dieta hipercalórica durante 10 semanas. Los resultados obtenidos mostraron que la dieta hipercalórica es eficiente para desarrollar las alteraciones metabólicas presentes en el SM, se observaron mejores resultados en los ratones macho,

por lo que se sugiere la utilización en este género para evitar los cambios hormonales presentes en las hembras adultas.

**Palabras clave:** Dieta hipercalórica, Modelo murino, Obesidad, Síndrome metabólico.

### INTRODUCCIÓN

El Síndrome Metabólico (SM) es un conjunto de alteraciones bioquímicas, fisiológicas y antropométricas que ocurren simultáneamente y son factores de riesgo para el desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus, dentro de los cuales se incluyen obesidad abdominal, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión arterial (Hernández *et al.*, 2018). De acuerdo con la ENSANUT 2018, a nivel nacional, en 2018 el porcentaje de adultos de 20 años y más con sobrepeso y obesidad es de 75.2 %. El desarrollo de la obesidad se produce por una ingesta excesiva, el bajo gasto de energía asociado con una deficiente actividad física y la acumulación de grasa visceral (Furnes *et al.*, 2009), este estado somete a las células adiposas a un estrés metabólico que induce un proceso oxidativo e inflamatorio que derivan en múltiples alteraciones como, mayor secreción de citocinas, reducción en la secreción de las adipocinas, resistencia a la insulina, aumento en la actividad del receptor de glucocorticoides y cambios en la distribución de la grasa corporal facilitando la lipotoxicidad en órganos como el hígado y el páncreas (Muñoz *et al.*, 2013; Urina *et al.*, 2018). Estas alteraciones metabólicas provocan enfermedades crónico-degenerativas como la obesidad, diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipidemias y enfermedades cardiovasculares (Gutiérrez *et al.*, 2018). Derivado de la pandemia mundial por el virus Sars-CoV 2 (COVID-19) se puso en evidencia que el SM también predispone un sistema inmune deficiente, incapaz de reaccionar adecuadamente contra una infección viral, y fue un factor de riesgo mortal para los pacientes que se contagiaron de COVID-19 (Pasquarelli-do-Nascimento *et al.*, 2020; Luzi *et al.*, 2021), Para reproducir la patogénesis y la terapia de este trastorno metabólico es necesario contar con modelos *in vivo* en animales apropiados, el modelo murino ofrece muchas ventajas en relación con otros modelos



animales ya que tiene numerosos procesos bioquímicos similares con el hombre, tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, permitiendo controlar las variables ambientales en las experimentaciones, además su genoma está descrito casi de manera completa y al menos el 80 % del ADN del ratón es idéntico al del ser humano (Perlman, 2016; Breschi *et al.*, 2017; Padilla *et al.*, 2017). Existen diferentes modelos en roedores que pueden desarrollar obesidad y diabetes mellitus, éstos se clasifican en modelos espontáneos como la rata Goto-Kakizaki (GK), el ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO), el ratón KK y la rata Zucker (fa/fa) y en modelos inducidos mediante la administración de fármacos como la estreptozotocina (STZ), por inducción hormonal administrando corticoides, somatostatina, glucagón, catecolaminas y tiroxina. Finalmente, están los modelos inducidos por manipulación genética de tres intervenciones, a) sobreexpresión, que origina ratones transgénicos, b) eliminación, genera los ratones “knock-out” y c) reemplazo (con una forma alterada), da origen a los ratones “knock-in” (Lutz y Woods, 2012). Estos modelos son costosos y con fenotipos diferentes, lo cual no reproduce lo que sucede en los humanos ya que se sabe que la obesidad es multifactorial. También existen los modelos de obesidad inducida por dieta (OID) que reproducen mejor la patología en humanos, sin embargo, la multivariada de dietas existentes y la susceptibilidad específica de algunos roedores, como la rata Sprawe Dawly y el ratón C56BL6/J hacen difícil estandarizar los modelos que reproduzcan la mayoría de las alteraciones del SM, además hay cepas más costosas que otras (Fuchs *et al.*, 2018). En México está disponible el ratón CD1 el cual es menos costoso que el ratón C56BL6/J, en un estudio realizado por Berlinsky *et al.* (2010), probaron 3 condiciones diferentes para inducir obesidad en ratones macho de esta cepa, y considerando como antecedente el mismo, en el presente trabajo se propone desarrollar un modelo utilizando una dieta hipercalórica para inducir las alteraciones presentes en el síndrome metabólico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Los animales utilizados fueron tratados de acuerdo con la Guía del cuidado de animales mexicana para el estudio con animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética para animales de estudio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Se emplearon 24 ratones CD1 hembras y machos de edad pre púber (obtenidos por el proveedor PROPECUA), los animales se mantuvieron en jaulas metálicas individuales, en una cámara aislada, con ciclos de 12 h luz/obscuridad, temperatura regulada a  $22 \pm 2$  °C y acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los ratones se distribuyeron en 2 lotes por género, con 6 ratones cada uno, y se asignaron a los tratamientos: a) Testigo hembras, b) Dieta hipercalórica hembras, c) Testigo machos, d) Dieta hipercalórica machos. La duración del tratamiento fue de 10 sem. El peso corporal se registró cada semana y el consumo de agua y alimento diariamente.

### Composición de las dietas

a) Testigo: dieta estándar para roedores (Rodent Lab Chow 5001) con una densidad energética de 3.18 Kcal/g, siendo 23 % de proteína, 4.5 % de grasas y 46.5 % de carbohidratos.

b) Dieta hipercalórica: Con una densidad energética de 4.81 Kcal/g, correspondientes a 17.3 % de proteína, 21.2 % de grasas y 48.5 % de hidratos de carbono, se le adicionaron vitaminas (AIN-93-NGX) y minerales (AIN-93-VX) para complementar la dieta, la cual fue una adaptación de la dieta TD.88137 (Teklad Global Harlan Laboratories, Inc), se elaboró en el laboratorio de Farmacología del desarrollo del departamento de Fisiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición de la dieta hipercalórica (DHC)

Ingrediente	Concentración g/Kg
Azúcar glass	340
Mantequilla	210
Caseína	195
Almidón de maíz	140.5
Celulosa	50
Mezcla de minerales	43
Mezcla de vitaminas	15
DL-metionina	3
Colina	2
Colesterol	1.5

### Bioensayos

*Curva de tolerancia a la glucosa:* se realizó al final del tratamiento, a los ratones con 8 h de ayuno se les administró por vía oral una solución de glucosa al 20 % una dosis de 0.2 g/Kg, y se registró la glucemia con el glucómetro (ABBOT) basal y a los tiempos 30, 60, 90 y 120 m después de la solución glucosada.

El perfil lipídico, incluido el colesterol sérico total, los triglicéridos y el col-HDL, se midieron utilizando los kits espectrofotométricos (RANDOX series) y el espectrofotómetro Architect C16000. Para el perfil hormonal se determinaron la insulina y la leptina en suero con la técnica de ELISA específico para ratones (Merck, Darmstadt, Alemania) y el lector de microplacas (Thermo Scientific®).

### Presión Arterial

Al final del tratamiento se registró la presión arterial por el método no invasivo con el equipo IITC Life Science® MRBP system. Para el periodo de acondicionamiento los ratones se introdujeron 10 m en un cepo de acrílico durante 3 d previos a la determinación. Posteriormente, el día de la prueba, se introdujeron en el cepo del equipo para inmovilizarlos y registrar la presión arterial sistólica, diastólica y media. El equipo se mantiene a una temperatura de 37 °C y se coloca el transductor de presión en la cola del ratón donde realiza el registro.

## Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente con el programa SigmaPlot ver 12.0. A los resultados bioquímicos y hormonales se analizaron con la prueba análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El peso corporal y la ingesta de alimento se analizaron con una prueba ANOVA bifactorial de medidas repetidas, con la prueba post Hoc Tukey, con un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0.05$ )

## RESULTADOS

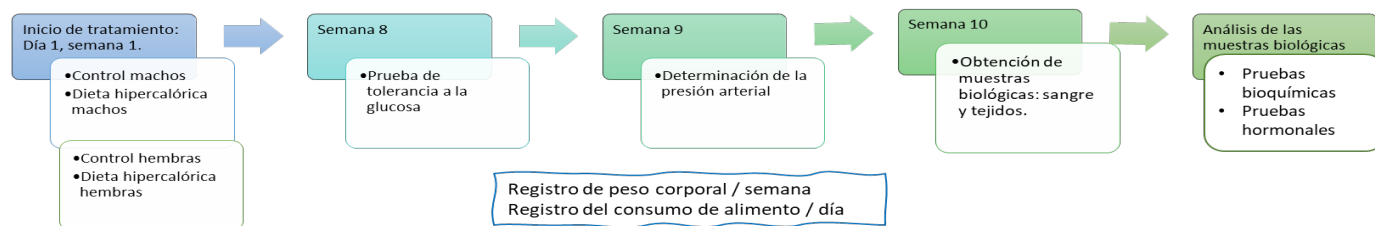
### Peso corporal de ratones CD1 con dieta hipercalórica

En todos los grupos los ratones aumentaron de peso gradualmente durante el tratamiento. Los ratones macho DHC mostraron un aumento significativo en el peso corporal a partir de la tercera semana ( $p < 0.005$ ), al final de las 8 semanas aumentaron 68 % de peso, mientras que el grupo control en machos solo incrementó 8 % (Fig. 2a). En cuanto a las hembras no existe diferencia significativa entre los dos grupos (Fig. 2b), sin embargo, las de DHC aumentaron 55 % su peso corporal, mientras que las del grupo control solo el 15 %.

El consumo de dieta hipercalórica se cuantificó en gramos y calorías. En la Figura 3a se observa que, en machos en ambos tratamientos, existe diferencia significativa de la primera a la tercera semana de consumo en gramos siendo superior el consumo de la dieta hipercalórica. En cuanto a consumo por kcal (Figura 3b), es mayor en la dieta hipercalórica con diferencia significativa de la primera a la cuarta semana del tratamiento. El consumo en gramos (Figura 3c) en las hembras tiene un comportamiento diferente a los machos, pues se observa que el grupo que se le proporcionó la dieta estándar consumieron más cantidad que los de la dieta hipercalórica con diferencia significativa en la semana 2 y de la 4 a la 7; sin embargo, en la Figura 2d se reporta que, a pesar de consumir menos en cantidad de gramos, el consumo en kcal es mayor en el grupo de la dieta hipercalórica en comparación con la dieta estándar.

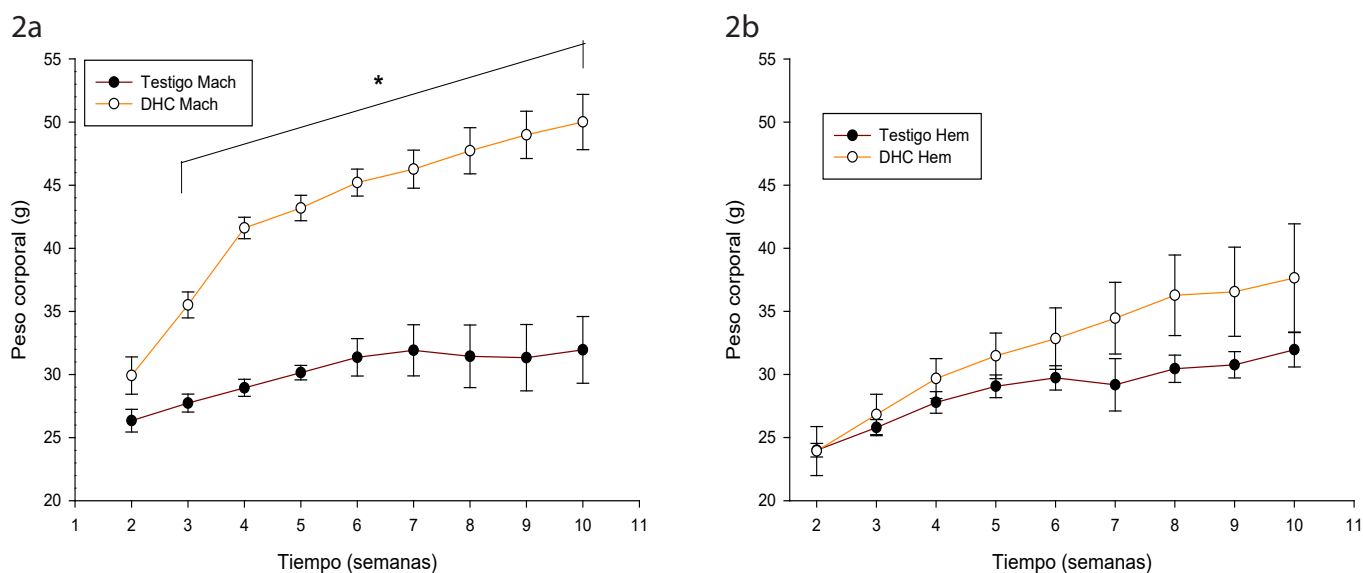
### Curva de tolerancia a la glucosa

En la Figura 4 se presentan los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa en machos (4a) y hembras (4b) determinada al final del tratamiento, se observó un aumento



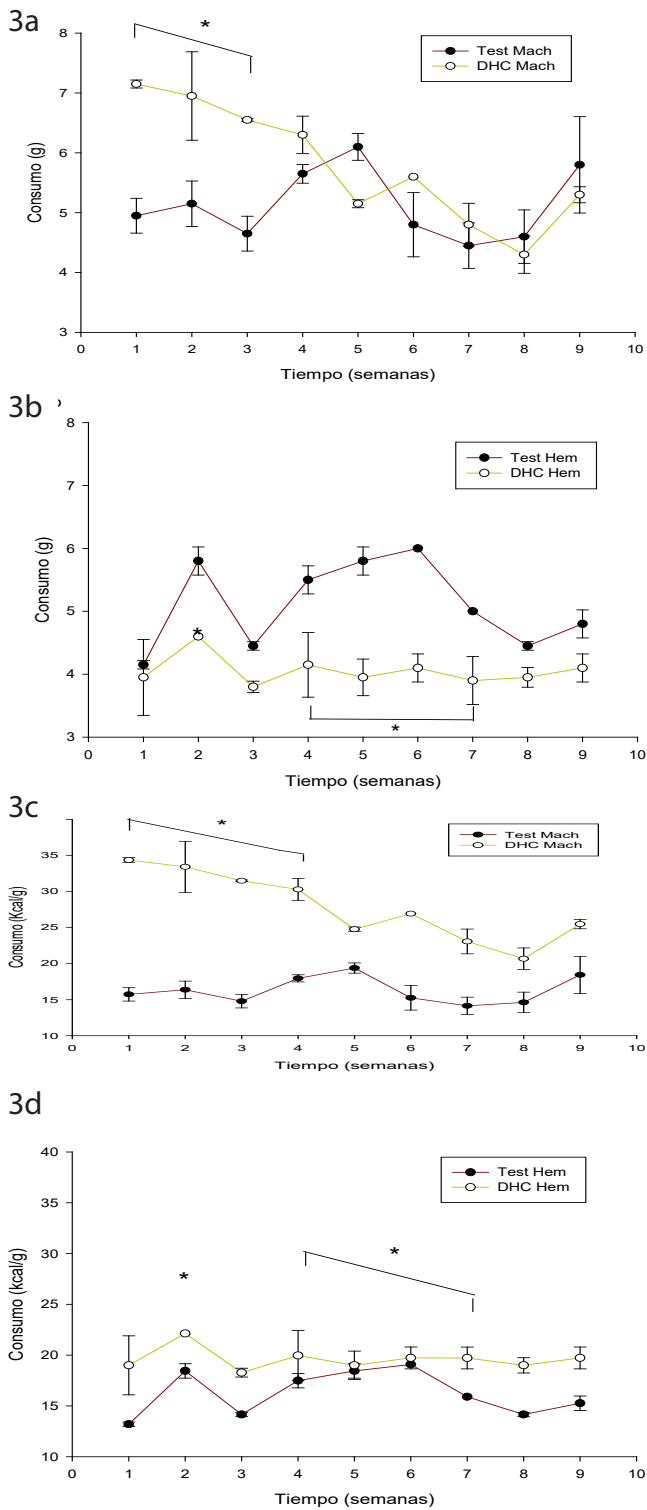
**Figura 1.** Diagrama general del desarrollo de un modelo murino de Síndrome metabólico con dieta hipercalórica.

**Figure 1.** General diagram of the metabolic syndrome model with hypercaloric diet.



**Figura 2.** Efecto de la dieta alta en grasa sobre el peso corporal en ratón CD - 1. a) machos; b) hembras. Los datos muestran la media  $\pm$  error estándar. (\*) diferencia significativa contra los testigos. ANOVA bifactorial de medidas repetidas, Tukey post hoc,  $p \leq 0.05$ .

**Figure 2.** Effect of high fat diet on corporal weight of CD - 1 mice. 1a Male; 1b: Female. Data represent mean  $\pm$  standard error. (\*) significant difference against control group. Repetitive measures bifactorial ANOVA, post hoc Tukey,  $p \leq 0.05$ .



**Figura 3.** Consumo de dieta alta en grasa en diez semanas de ratones CD - 1. a) consumo de alimento de machos; b) consumo de alimento de hembras; c) consumo en calorías de machos; d) consumo en calorías de hembras. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. (\*) diferencia significativa contra el grupo control. ANOVA bifactorial de medidas repetidas, Tukey post hoc,  $p \leq 0.05$ .

**Figure 3.** High fat diet consumption for ten weeks, by CD - 1 mice. a) Male consumption; b) Female consumption; c) Male caloric consumption; d) Female caloric consumption. Data represent mean  $\pm$  standard error. (\*) significant difference against control group. Repetitive measures bifactorial ANOVA, post hoc Tukey,  $p \leq 0.05$ .

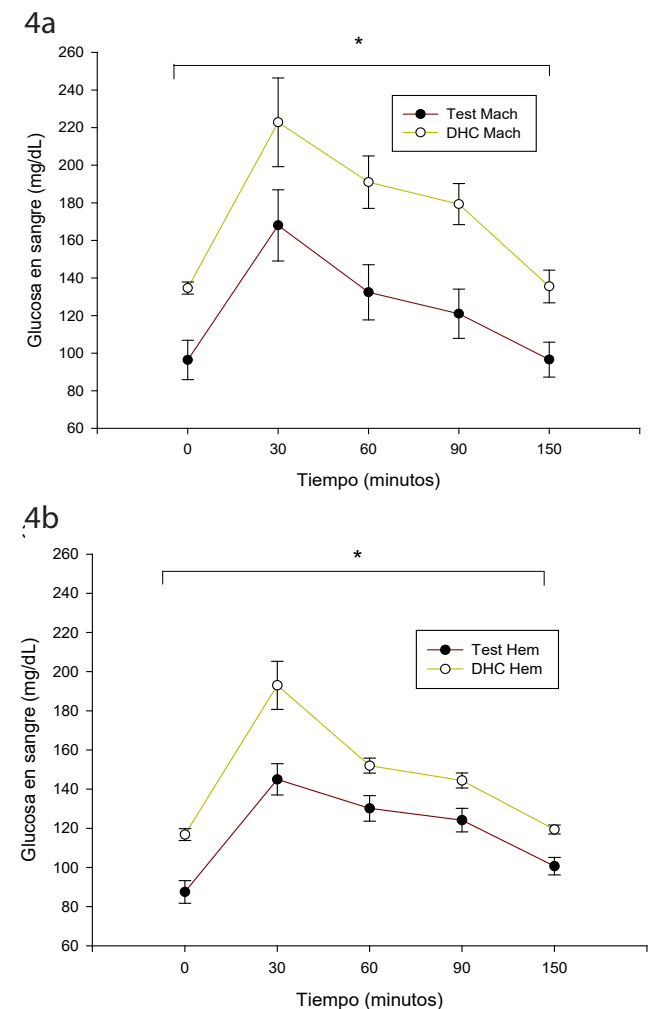
significativo ( $p < 0.005$ ) durante todo el tiempo de la prueba en los ratones DHC, tanto en hembras como en machos, en comparación con el respectivo grupo testigo, por lo que se propone que la dieta hipercalórica desarrolló intolerancia a la glucosa en los ratones.

### Presión arterial

En la figura 5 se muestran los resultados de presión arterial en machos (5a) y hembras (5b). Se observa que los ratones de tratamiento DCH muestran mayor presión arterial tanto sistólica como diastólica y media comparados con los ratones con dieta estándar ( $p < 0.005$ ) se observa la misma tendencia en ambos sexos.

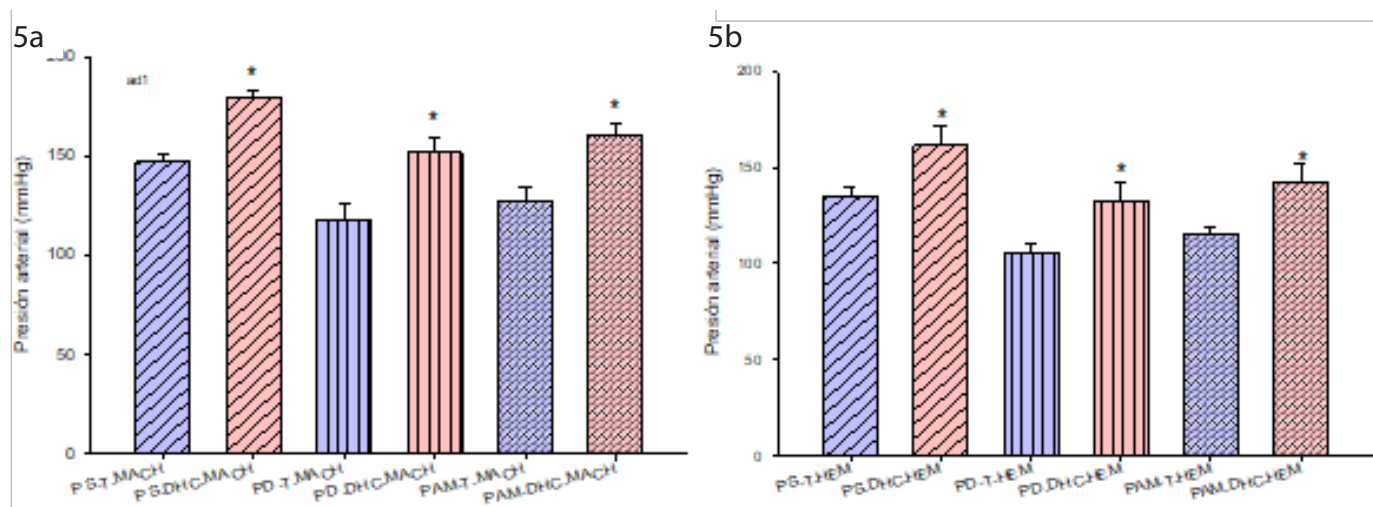
### Perfil lipídico en ratones CD1 con dieta hipercalórica

Los resultados del perfil lipídico incluido el colesterol total, triglicéridos y col-HDL se muestran en la Tabla 2, el col-



**Figura 4.** Curva de tolerancia a la glucosa en ratón CD - 1 con dieta hipercalórica y dieta estándar. a) machos; b) hembras. Los datos muestran la media  $\pm$  error estándar. (\*) diferencia significativa con el testigo en los diferentes tiempos. ANOVA bifactorial de medidas repetidas, post hoc Tukey,  $p \leq 0.05$ .

**Figure 4.** Glucose tolerance curve in CD - 1 mice with hypercaloric and standard diet. 3a: Male; 4b) Female. Data represent mean  $\pm$  standard error. (\*) significant difference against control group at different times. Repetitive measures bifactorial ANOVA, post hoc Tukey,  $p \leq 0.05$ .



**Figura 5.** Efecto de la dieta hipercalórica sobre la presión arterial en ratón CD-1. a) Presión arterial en machos; b) Presión arterial en hembras. Los datos representan las medias  $\pm$  el error estándar. (\*) diferencia significativa contra el grupo control (ANOVA unifactorial, Tukey post hoc,  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 5.** Hypercaloric diet effect on CD-1 mice arterial pressure. a) Male arterial pressure; b) Female arterial pressure. Data represent mean  $\pm$  standard error. (\*) significant difference against control group (unifactorial ANOVA, post hoc Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

LDL se determinó utilizando la ecuación de Friedewal, también se muestra el índice aterogénico. Respecto al colesterol total, existe un aumento significativo en los machos DHC 2.8 veces más que el grupo testigo. En las hembras no existe diferencia significativa ( $p > 0.005$ ) en ambos grupos. En cuanto a triglicéridos existe diferencia significativa en los machos con dieta hipercalórica (109.27 mg/dL) en comparación con el grupo control (31.91 mg/dL). En las hembras no existe diferencia significativa ( $p > 0.005$ ) en ambos grupos. Finalmente, respecto a HDL existe diferencia significativa en los machos con dieta hipercalórica (78.12 mg/dL) en comparación con el grupo control (156.24 mg/dL). En las hembras no existe diferencia significativa ( $p > 0.005$ ) en ambos grupos.

Los triglicéridos en el caso de los machos de DHC incrementaron casi 3 veces más que el grupo testigo, mientras que en las hembras de DHC hubo una disminución significativa respecto al testigo. Con respecto al col-HDL y col-LDL aumentaron 1.2 y 17 veces respectivamente comparados con el control por lo que el índice aterogénico también fue mayor en los ratones macho DHC. En cambio, en las hembras, aunque aumentaron el col-HDL y el col-LDL fue más discreto, por lo que el índice aterogénico no es diferente del grupo testigo.

#### Perfil hormonal en ratones CD1 con dieta hipercalórica

El perfil hormonal incluye la insulina y la leptina, los resultados se presentan en la Tabla 2. Respecto a la insulina, se encontró que en machos del grupo DHC incrementó 2.5 veces más comparados con el grupo testigo, mientras que en hembras de DHC el incremento fue menor, aunque sí es significativo respecto del grupo testigo.

En relación con el perfil hormonal se observó que tanto la insulina como la leptina y la glucemia fueron significativamente mayores en los machos de DHC y el índice HOMA-IR también aumentó comparados

**Tabla 2.** Perfil lipídico y hormonal en ratones CD1 con dieta hipercalórica. **Table 2.** Lipidic and hormonal profile in CD1 mice with hypercaloric diet.

Variable sérica	Testigo Macho	DHC macho	Testigo Hembra	DHC Hembra
Colesterol total (mg/dL)	77.1 $\pm$ 0.4	195.3 $\pm$ 11.4*	85.6 $\pm$ 9.8	101.2 $\pm$ 4.8*
Triglicéridos (mg/dL)	37.3 $\pm$ 0.4	109.3 $\pm$ 18.7*	71.3 $\pm$ 6.3	53.7 $\pm$ 4.1*
Col-HDL (mg/dL)	62.6 $\pm$ 0.3	78.1 $\pm$ 17.8*	199.6 $\pm$ 17.1	217.0 $\pm$ 11.7*
Col-LDL (mg/dL)	7.04 $\pm$ 0.4	121.5 $\pm$ 1.2*	17.7 $\pm$ 3.5	39.5 $\pm$ 5.0*
Índice aterogénico CT/HDL	1.24 $\pm$ 0.1	3.81 $\pm$ .02*	1.58 $\pm$ 1.6	2.0 $\pm$ .01
Glucemia (mg/dL)	96.4 $\pm$ 10.5	136.7 $\pm$ 3.2*	87.5 $\pm$ 5.8	116.8 $\pm$ 3.0*
Insulina (ng/mL)	0.58 $\pm$ 0.2	1.04 $\pm$ 0.5*	0.61 $\pm$ 0.2	0.93 $\pm$ 0.3
Leptina (pg/mL)	0.25 $\pm$ 0.05	2.40 $\pm$ 0.9*	2.41 $\pm$ 1.7	4.66 $\pm$ 1.8*
Índice HOMA-IR	3.0 $\pm$ 0.8	6.4 $\pm$ 0.3*	3.2 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 0.3

Col-HDL: Lipoproteína de alta densidad, Col-LDL: Lipoproteína de baja densidad. DHC: Dieta hipercalórica. Los datos representan las medias  $\pm$  el error estándar. Medias con asterisco por columna son estadísticamente diferente ANOVA de una vía, Tukey post hoc,  $p \leq 0.05$ .

con el testigo macho, En las hembras solo se aprecia el incremento de la glucemia y la leptina, pero no hay diferencia con la insulina comparados con el grupo testigo hembras, y el índice HOMA-IR tampoco difiere.

#### DISCUSIÓN

La dieta hipercalórica a menudo se ha utilizado para reproducir trastornos metabólicos en roedores, similares en algunos casos, a los que se presentan en humanos con obesidad mórbida. En el presente trabajo se propone que el con-



sumo de la dieta hipercalórica en los ratones CD1 desarrolla un estado metabólico parecido al observado en el Síndrome metabólico en humanos. Existen diferentes asociaciones internacionales que se han dedicado a establecer los criterios para la definición del Síndrome metabólico, entre ellas se encuentran el Panel III del Tratamiento para Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP ATP-III), la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Grupo Europeo de Estudio de Resistencia a la Insulina, quienes dieron una definición del síndrome metabólico y que posteriormente fue modificado por la American Association of Clinical Endocrinologists y la International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention y por la American Heart Association en colaboración con el National Heart, Lung and Blood Institute. Finalmente, en 2009, se llegó a una definición consensuada emitida por la International Diabetes Federation, el National Heart, Lung and Blood Institute, la American Heart Association, El World Heart Federation, la International Atherosclerosis Society y la International Association for the Study of Obesity.

Dentro de los criterios establecido para determinar el Síndrome metabólico se encuentra la obesidad, la hiperglucemia en ayuno, la presión arterial >130/85 mmHg, una triglicéridemia > 150 mg/dL y el col-HDL < 40 mg/dL (McCracken *et al.*, 2018). Estas alteraciones pueden afectar tanto a hombres como mujeres, los valores de referencia pueden variar según el género, la edad y el tipo de dieta que consumen (Hernández *et al.*, 2018).

La administración de dietas modificadas en especies roedoras ha logrado reproducir algunos de las alteraciones presentes en el síndrome metabólico, pero no todas (de Moura *et al.*, 2021). Unas especies son más susceptibles a desarrollar obesidad, pero no resistencia a la insulina o hipertensión, otras solo reproducen la diabetes, pero sin hiperlipemia (Suleiman *et al.*, 2019). La propuesta del modelo desarrollado en el presente trabajo reproduce al menos 3 de los criterios emitidos en 2009. Se utilizaron los ratones CD - 1 que son de fácil acceso en México y que son más económicos que otras cepas modificadas o específico sensibles, además se comparó el efecto en machos y en hembras para determinar si el género interviene en el desarrollo del síndrome metabólico.

De acuerdo con los resultados, los machos establecieron cambios metabólicos más cercanos a los del síndrome metabólico, incluyendo aumento de peso, la hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hiperlipemia e hipertensión, además de los cambios hormonales de hiperinsulinemia e hiperleptinemia. En cambio, en las hembras solo se reprodujeron algunas de las alteraciones metabólicas e hipertensión, sin cambios hormonales ni obesidad.

Estos resultados son importantes porque el modelo propuesto en machos constituye una herramienta accesible de gran utilidad para evaluar otros posibles cambios que ocurre en el síndrome metabólico, como inflamatorios, inmunológicos, respiratorios y renales, que derivado de la pandemia de COVID-19 dejaron en evidencia que padecer síndrome metabólico incrementó la mortalidad del virus.

El aumento de peso en los machos se debe principalmente a la ingesta mayor de alimento y de consumo calórico, lo que incrementó el tejido adiposo y consecuentemente las

alteraciones de la insulina y los lípidos. En 8 sem se lograron observar estos cambios, lo que también es una ventaja sobre otros modelos de obesidad que requieren hasta 12 semanas o más (Fuchs *et al.*, 2018).

La resistencia a la insulina también es un marcador del SM, se relaciona con la obesidad y la diabetes mellitus Tipo 2. La hiperglucemia se genera porque el hígado aumenta la producción de glucosa, y las células  $\beta$  del páncreas incrementan la producción de insulina para regular la glucemia introduciéndola a los tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo, sin embargo, al presentarse la resistencia a la hormona persiste la hiperglucemia y la hiperinsulinemia (Muñoz, 2013). Se puede relacionar la glucemia con la concentración de insulina en sangre en un índice llamado HOMA-IR (del acrónimo en inglés: Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance), se utiliza como indicador de resistencia a la insulina (Oh *et al.*, 2021). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta propuesta de modelo de SM, se encontró incrementado el índice HOMA-IR en los machos de DHC, lo que indica la resistencia a la insulina en los ratones.

La leptina es una hormona que secreta el tejido adiposo y que participa en la regulación de la ingesta de alimento, en la obesidad se presenta resistencia al efecto de esta hormona, lo que conduce a hiperfagia y aumento del tejido adiposo, este puede ser el origen de la resistencia a la insulina. Se relaciona con un nivel mayor de inflamación derivado de factores proinflamatorios que libera el tejido adiposo en exceso, como el TNF alfa y la IL-6, que además incrementan el estado de oxidación en el organismo y el riesgo de generar aterosclerosis (Lemieux y Després, 2020), y alteraciones cardiovasculares como hipertensión y/o angina de pecho (Rodríguez *et al.*, 2020). Todas las alteraciones metabólicas y hormonales que se observaron en los ratones macho con DHC reproducen el riesgo de desarrollar diabetes, hipertensión y aterosclerosis, además se pueden evaluar otros variables como inflamación y oxidación tisulares.

Adicionalmente, al igual que en otros modelos, se puede disponer de los órganos para hacer análisis complementarios, como el hígado, el corazón, los pulmones, el mismo tejido adiposo, lo que permite determinar el daño tisular específico por el SM.

En contraste, las hembras no desarrollaron todas las alteraciones de SM, se ha reportado que en las hembras el consumo de alimentos coincide con el ciclo hormonal, pues se ha observado una baja ingesta de alimentos cuando los niveles de estrógeno son altos y una alta ingesta cuando no hay ovulación (Varma *et al.*, 1999). Otro factor importante es el que tienen los estrógenos sobre el metabolismo lipídico, Reyna-Villasmil *et al.* (2007) reportaron que la administración exógena de estrógenos a mujeres posmenopáusicas con histerectomía y salpingo-ooforectomía bilateral, redujo los niveles de col-LDL e incrementan los niveles de col-HDL. Palmisano *et al.* (2017) también reportaron que la combinación de varios estrógenos y progestinas en mujeres posmenopáusicas regula los niveles séricos de triglicéridos, pero no disminuye el riesgo cardiovascular. Este efecto de los estrógenos lo observamos con las hembras de DHC, por lo cual no es un modelo adecuado para evaluar alteraciones lipídicas, y no reproduce completamente las complicaciones del SM.

## CONCLUSIONES

El modelo de ratón macho CD1 con DHC indujo obesidad, hiperglucemia, hipertensión, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia y aumento de las hormonas leptina e insulina, todas estas alteraciones relacionadas con el SM, por lo que se propone como un modelo murino para el estudio de este padecimiento.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP 20210922) por el apoyo recibido en la presente investigación.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

## REFERENCIAS

- Breschi, A., Gingeras, T. R., y Guigó, R. 2017. Comparative transcriptomics in human and mouse. *Nature Reviews Genetics* (Vol. 18, Issue 7, pp. 425-440). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.19>
- Breslin, W.L., Strohacker, K., Carpenter, K.C., Esposito, L. y McFarlin, B.K. 2010. Weight gain in response to high-fat feeding in CD-1 male mice. *Laboratory Animals*, 44: 231-237. DOI: 10.1258/la.2010.009114
- ENSANUT. 2018. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Disponible en <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes>. Acceso: Enero 2022, 1-41.
- de Moura e Dias, M., dos Reis, S.A., da Conceição, L.L. et al. 2021. Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. *Diabetol Metab Syndr* 13, 32. <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00647-2>
- Fuchs, T., Loureiro, M. de P., Macedo, L. E., Nocca, D., Nedelcu, M., y Costa-Casagrande, T. A. 2018. Animal models in metabolic syndrome. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes* (Vol. 45, Issue 5). Colegio Brasileiro de Cirurgioes. <https://doi.org/10.1590/0100-6991e-20181975>
- Furnes, M. W., Zhao, C. M., y Chen, D. 2009. Development of obesity is associated with increased calories per meal rather than per day. A study of high-fat diet-induced obesity in young rats. *Obesity Surgery*, 19(10), 1430-1438. <https://doi.org/10.1007/s11695-009-9863-1>
- Gutiérrez-Solis, A. L., Datta Banik, S., y Méndez-González, R. M. 2018. Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 16(8), 395-405. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0157>
- Hernández-Ruiz, Z., Rodríguez-Ramírez, S., Hernández-Cordero, S., y Monterrubio-Flores, E. 2018. Patrones dietéticos y síndrome metabólico en mujeres con exceso de peso de 18 a 45 años de edad. *Salud Pública de México*, 60(2), 158-165. <https://doi.org/10.21149/8847>
- Lemieux, I., y Després, J. P. 2020. Metabolic syndrome: Past, present and future. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1-7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12113501>
- Lutz, T. A., y Woods, S. C. 2012. Overview of animal models of obesity. *Current Protocols in Pharmacology*, SUPPL.58. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0561s58>
- Luzi, L., Bucciarelli, L., Ferrulli, A., Terruzzi, I., y Massarini, S. 2021. Obesity and coVid-19: The ominous duet affecting the renin-angiotensin system. In *Minerva Endocrinology* (Vol. 46, Issue 2, pp. 193-201). Edizioni Minerva Medica. <https://doi.org/10.23736/S2724-6507.20.03402-1>

- McCracken, E., Monaghan, M., y Sreenivasan, S. 2018. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology*, 36(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.clinidmatol.2017.09.004>
- Muñoz, C., Bedoya, B., y Veásquez RC. 2013. An approach to the etiology of metabolic syndrome. *Colombia Médica*, 44, 57-63.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Agosto, 2001. [https://www.gob.mx/uploads/attachment\\_data/file](https://www.gob.mx/uploads/attachment_data/file)
- Oh, S., Lee, S. Y., Kim, D. Y., Woo, S., Kim, Y., Lee, H. J., Jang, H. B., Park, S. I., Park, K. H., y Lim, H. 2021. Association of dietary patterns with weight status and metabolic risk factors among children and adolescents. *Nutrients*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/nu13041153>
- Padilla-Fernández, B., García-Cenador, M. B., Rodríguez-Marcos, P., López-Marcos, J. F., Antúnez-Plaza, P., Silva-Abuín, J. M., López-Montañés, D., García-Criado, F. J., y Lorenzo-Gómez, M. F. 2017. Modelo murino experimental de cáncer renal. *Actas Urológicas Españolas*, 41(7), 445-450. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2016.11.005>
- Palmisano, B. T., Zhu, L., y Stafford, J. M. 2017. Role of estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1043, pp. 227-256). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_12)
- Pasquarelli-do-Nascimento, G., Braz-de-Melo, H. A., Faria, S. S., Santos, I. de O., Kobinger, G. P., y Magalhães, K. G. 2020. Hypercoagulopathy and Adipose Tissue Exacerbated Inflammation May Explain Higher Mortality in COVID-19 Patients With Obesity. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00530>
- Perlman, R. L. 2016. Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. *Evolution, Medicine, and Public Health*, eow014. <https://doi.org/10.1093/emph/eow014>
- Reyna-Villasmil, E., Guerra-Velásquez, M., Reyna-Villasmil, N., Mejía-Montilla, J., y Flores-Montero, I. 2007. Efectos del estradiol y acetato de noretisterona sobre los lípidos y la lipoproteína (a) sérica en posmenopáusicas ooforectomizadas. *Rev. Obstet Ginecol Venez*, 1, 41-46. <https://www.researchgate.net/publication/262590698>
- Rodríguez-Calvo, R., Samino, S., Guaita-Esteruelas, S., Martínez-Micaelo, N., Heras, M., Girona, J., Yanes, O., Correig, X., y Masana, L. 2020. Plasma glucose, triglycerides, VLDL, leptin and resistin levels as potential biomarkers for myocardial fat in mice. *Clinica e Investigación En Arteriosclerosis*, 32(1), 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2019.05.001>
- Suleiman, J. B., Mohamed, M., y Bakar, A. (2020). A systematic review on different models of inducing obesity in animals: Advantages and limitations. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 7(1), 103-114. <https://doi.org/10.5455/javar.2020.g399>
- Urina-Jassir, D., Urina-Jassir, M., Urina-Triana, M., Mantilla-Morrón, M., Urina-Triana, M., y Galeano-Muñoz, L. 2018. La prevalencia del síndrome metabólico en mujeres postmenopáusicas. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 13, 1-6.
- Varma, M., Chai, J.-K., Meguid, M. M., Laviano, A., Gleason, J. R., Yang, Z.-J., y Blaha, V. 1999. Effect of estradiol and progesterone on daily rhythm in food intake and feeding patterns in Fischer rats. In *Physiology and Behavior* (Vol. 68).
- Vera, F., Pino, J., Campos-Cabaleiro, V., Ruiz-Fernández, C., Mera, A., Gonzalez-Gay, M. A., Gómez, R., y Gualillo, O. 2018. Obesity, fat mass and immune system: Role for leptin. *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00640>

# Factores asociados a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) en mujeres del noroeste de México

Associated factors with human papillomavirus (HPV) infection in adult women from northwest Mexico

Gloria Guadalupe Morales-Figueroa<sup>1</sup>, Marlene Bravo-Parra<sup>1</sup>, Karla María Olivas-Matas<sup>1</sup>, Julián Esparza-Romero<sup>1</sup>, Manuel Valenzuela-Zamorano<sup>2</sup>, Oscar Manuel Olivas-López<sup>2</sup>, Luis Quihui-Cota<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Departamento de Nutrición Pública y Salud. Hermosillo Sonora México.

<sup>2</sup> Hospital ISSSTESON. Departamento de Ginecología. Hermosillo, Sonora, México.

## RESUMEN

Investigaciones sobre la asociación entre factores de riesgo y la infección por VPH en mujeres adultas hermosillenses no existen, y por ello se diseñó un estudio de casos y controles (1:2) pareado por edad para analizar este problema de salud pública a nivel local. Participaron 33 y 66 mujeres con y sin VPH respectivamente (edad media = 41,8 ± 7,9 años). La diferencia de características entre grupos se probó con regresión logística condicional (univariada). La ingesta de antioxidantes se ajustó por energía total utilizando el método residual. Se generaron dos modelos de regresión logística multivariada para identificar los factores asociados con VPH. En ambos modelos, el mayor consumo de licopeno (OR = 0,96, IC = 0,95- 0,99, p = 0,019) y la mayor Capacidad Antioxidante Total plasmática (CATp) (OR = 0,05, IC 95% = 0,03- 0,7, p = 0,024), ajustados aún con el número de embarazos, número de parejas sexuales, y total de parejas sexuales por año, redujeron el riesgo a VPH. Los embarazos múltiples y la conducta sexual incrementaron el riesgo a VPH, y los mayores consumos de licopeno y CATp la redujeron en las mujeres de este estudio. Debe fortalecerse la educación sexual, así como el consumo de antioxidantes en las mujeres hermosillenses para prevenir el desarrollo del cáncer de cuello uterino.

**Palabras clave:** VPH, Antioxidantes dietarios, Capacidad antioxidante total, Noroeste de México.

## ABSTRACT

Research on the association between risk factors and HPV infection in adult women from Hermosillo does not exist, so a study of cases and controls (1:2) matched by age was designed to analyze this public health problem at a local level. Participants were 33 and 66 women with and without HPV, respectively (mean age = 41.8 ± 7.9 years). The difference in characteristics between groups was tested with conditional logistic regression (univariate). Antioxidant intake was adjusted by total energy using the residual method. Two multivariate logistic regression models were generated to identify factors associated with HPV. In both models, the higher consumption of lycopene (OR = 0.96, CI = 0.95-0.99, p = 0.019) and the higher Plasma Total Antioxidant Capacity (TACp) (OR = 0.05, CI 95% = 0.03 - 0.7, p = 0.024), even adjusted by the

number of pregnancies, number of sexual partners, and total number of sexual partners per year, reduced the risk of HPV. Multiple pregnancies and sexual behavior increased the risk of HPV, whilst higher consumption of lycopene and TACp reduced it in the women in this study. Sex education should be strengthened, as well as the consumption of antioxidants in women from Hermosillo to prevent the development of cervical cancer.

**Key words:** HPV, Antioxidant Dietary, Total Antioxidant Capacity, Northwest Mexico.

## INTRODUCTION

Cervical cancer is the most common cancer in women, with around 604 000 new cases and 342 000 deaths; with about 90% of the new cases and deaths occurring in poor countries worldwide in 2020 (WHO). Human Papilloma Virus (HPV) infection is an important factor –but not sufficient by itself– in the development of cervical cancer, and remains a serious public health problem (McMullin, 2009). In addition, age at which sexual intercourse begins, the number of partners/sexual partners, lack of condoms use, low socioeconomic status, multiparity, smoking, and low antioxidant consumption, are all also recognized risk factors for HPV infection (Liang *et al.*, 2018). Georgescu *et al.* (2018) published that a deficiency of body antioxidant compounds may result in DNA damage and low immune-competence that may promote the HPV infection and carcinogenesis. Barchitta *et al.* (2020) found that 84 HPV-positive women reported lower intake of antioxidants (zinc, manganese, and vitamins A and C) than non-infected women. Jordá *et al.* (2020) studied 505 women between 15 and 49 years old and reported higher HPV infections in both women aged 15 - 24 years and women with more sexual partners. Studies in different regions have stated that the highest prevalence of HPV is often found in women younger than 25 years of age because of their risky sexual behavior, little awareness about the HPV infection, and low rate of vaccination (Herrera-Ortiz *et al.*, 2018). In Mexico, the HPV prevalence in women ranged from 4.1 % to 65.0 % in 2016 (Bruni *et al.*, 2021); and it has been estimated that 95 % to 99 % of cases of cervical cancer are associated with HPV (Soto-Fuenzalida *et al.*, 2020). That's why, Mexico is

\*Autor para correspondencia: Luis Quihui Cota

Correo electrónico: lquihui@ciad.mx

Recibido: 21 de junio de 2022

Aceptado: 15 de agosto de 2022



recognized as one of the American regions with a high rate of HPV infection (Bruni *et al.*, 2021) which may get worse if population has low consumption of fruit and vegetables. Evidence of this was published in 2016 by a Mexican survey which reported that only 51.4 % and 42.3 %, and 47 % and 34.6 % of the population consumed fruits and vegetables, at national level and northern region, respectively (Secretaría de Salud, 2016). Since research on this topic is limited in Mexico, the present study investigated the role of the personal, lifestyle, clinical history, socioeconomic, and antioxidant status to the presence of HPV-infection in adult women from a community of the northwest region of Mexico.

## MATERIAL AND METHODS

### Participants and study design

This study was performed with women at the George Papanicolaou Group (GPG) founded to care, monitor and support cancer patients; and a hospital institute (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora, ISSSTESON) both set at the state of Sonora (northwest region of Mexico), to investigate the associated risk factors to HPV infection. Sonora is bordering to the east with the state of Chihuahua, south to the state of Sinaloa and north to the state of Arizona of the United States.

It was a case-control study matched by age ( $\pm 5$  years) conducted from November 2015 to July 2017. Thirty-three women with HPV infection and 66 controls matched (1: 2) for age with or free of HPV infection respectively confirmed by hybrid capture result and history records, agreed to participate. The common eligibility criteria for both cases and matched controls was not being pregnant or lactating at the time of recruitment.

The Ethic Committees of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD A.C), GPG and ISSSTESON approved all procedures involved in this study. All participants signed an informed consent before work began.

### Study measurements

Standing height was measured using a stadiometer (Holtain Ltd., Dyfed, UK) with  $2.05 \pm 0.001$  m capacity. Weight was measured (to the nearest 10 g) using a digital electronic scale (AND FV-150 KA1, A&D Co. Ltd., Toshima-ku, Tokyo, Japan) according to standardized recommendations. Weight and height were then used to estimate the Body Mass Index (BMI,  $\text{kg}/\text{m}^2$ ). The reference values are normal for BMI  $>18.5 - 24.9$ , overweight for BMI  $\geq 25 - 29.9$ , and obesity for BMI  $\geq 30 - 34$  (CDC, 2022).

A 90-item food-frequency questionnaire (FFQ) designed and validated to estimate usual food consumption in a Mexican women population of low socioeconomic status, age 15 - 54 years, was used in this study. This FFQ was adapted to the population of Sonoran women (Romieu *et al.*, 1999; Quizán-Plata y Ortega, 2000). Participants were asked to report the consumption frequency for each food item during the past year. Results were expressed as g/day.

Exfoliated cells from the cervical canal were collected by an obstetrician. All samples were correctly packed and shipped to the GPG and ISSSTESON laboratories for processing within 48 h. The HPV test was performed in the Laboratorio Estatal de Salud Pública using the Hybrid Capture II (HC2 Digene Corp., Qiagen) to detect oncogenic HPV sub-types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68. The analytical sensitivity of the Combined-Probe Cocktail Method is 97.5, with a specificity of 84.3 (PAHO, 2019).

### Collection of information and biological samples

Personal, lifestyle, clinical history and socioeconomic information of the participants was collected by using questionnaires, and also blood samples were taken. These activities were carried out in the GPG and ISSSTESON facilities.

*Personal:* Marital status was categorized as married (0) or unmarried (1). Occupational status was assigned (0) for employed or (1) for unemployed (including homemaker). Age at menarche was assigned as (0) if  $\geq 12$  years or (1) if  $< 12$  years. The number of previous pregnancies was assessed as (0) for  $\leq 1$  pregnancy or (1) for  $> 1$  pregnancies.

*Lifestyle:* Age at first sexual intercourse was (0) for  $\geq 18$  years or (1) for  $< 18$  years. The total number of sexual partners in the lifetime was classified as (0) for  $\leq 1$  sexual partners or (1) for  $> 1$  sexual partners, while the total number of sexual partners in the last year was assigned as (0) for  $\leq 1$  or (1) for  $> 1$ . The use of barrier contraceptives was coded as (0) for condom alone or accompanied by another method (Intrauterine device, injection, vasectomy, rhythm and tablets), or (1) when intrauterine device, injection, vasectomy, rhythm, abstinence or tablets were reported (Winer *et al.*, 2006). Use of oral contraceptives was assigned (0) for  $\leq 6$  years or (1) for  $> 6$  years. Active smoking was scored as (0) for non-smokers or (1) for reports of smoking at least 1 cigarette per day/week. Passive smoking was assigned as (0) when the subject was not exposed to tobacco smoke regularly/sporadically during the past year or (1) when she was exposed.

*Clinical history:* The presence of sexually transmitted diseases (STDs), such as trichomoniasis, herpes simplex, condyloma acuminata, syphilis, gonorrhea, hepatitis B or chlamydia, was assessed as (0) when not reported or (1) when reported. Finally, type 2 diabetes confirmed by medical records was classified as (0) absent or (1) present.

*Socioeconomic:* Socioeconomic status (SS) was evaluated using a questionnaire from the Mexican Association of Market Intelligence and Public Opinion (AMAI) (López-Romo, 2009), which applies the following classification: A/B (wealthy), C+ (income or standard of living slightly above average), C (average income and standard of living), D+ (income or standard of living slightly below average), D- (low income and standard of living), and E (lowest income and standard of living). The SS was categorized as either low level (D+ and D-), classified as (1), or high-medium level (A/B, C+, C), assessed as (0).

*Blood collection:* During visits to the participants, and after an overnight fast, a 10 - mL blood sample was taken



by venipuncture in BD vacutainer tubes (Becton Dickson of 21 G x 38 mm). Samples were transported to CIAD A.C. to separate plasma by centrifugation (ThermoFisher Scientific. Laboratory Centrifuge. Germany, 2016) at 5000 x *g* for 10 min at 4 °C, within 2 h of collection and stored as aliquots in properly labeled 1.5 mL amber Eppendorf tubes at - 80°C until analysis. The entire process was performed under conditions of light protection. TAC was determined using the Randox® NX2332 commercial reagent kit (UK, 2016) following the manufacturer's instructions (Jozanov-Stankov *et al.*, 2009).

### Statistical analysis

An exploratory analysis was performed to describe the variables and create new dichotomous or polychotomous variables. Means and standard deviations were estimated for the continuous variables while medians were estimated for the antioxidant nutrient intakes. Prevalence was estimated for all categorical variables. All antioxidant intakes were total energy-adjusted using the residual method (Willett, 1998). In addition, plausible biological variables with OR ≠ 1 and  $p \leq 0.2$  were selected by univariate logistic regression. Selected variables were analyzed by the multivariate logistic regression to generate the models. Then, the variables in the preliminary models were evaluated for interaction ( $p \leq 0.05$ ), collinearity ( $r > 0.8$ ) and linearity. All data were analyzed using the STATA/SE version 12.0 (StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP).

## RESULTS

### Baseline characteristics between groups

This age-matched, case-control study of 99 women (mean age  $41.8 \pm 7.9$  years, range: 23-56 years old) from northwest Mexico, explored the differences between the control and case (HPV-infection) groups regarding all variables in this study (Tables 1 and 2). No differences were found in age, weight, height, BMI and personal and socioeconomic factors ( $p > 0.05$ ) between the study groups ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

An unadjusted analysis failed to detect any difference in the age at menarche (unadjusted OR = 1.84, 95 % CI = 0.798 - 4.295,  $p = 0.156$ ), or age at first sexual intercourse ( $\geq 18$  years) (unadjusted OR = 1.5, 95% CI = 0.575 - 3.912,  $p = 0.407$ ) between groups. The women with more than one pregnancy (unadjusted OR = 6.1, 95 % CI = 2.0 - 18.1,  $p = 0.001$ ), and those with more both sexual partners (unadjusted OR = 2.4, 95 % CI = 1.0 - 6.08,  $p = 0.048$ ), and annual sexual partners (unadjusted OR = 5.9, 95 % CI = 2.2 - 16.1,  $p = 0.001$ ), had a higher probability of being HPV-positive. Also, the women who used oral contraceptives for more than 6 years (unadjusted OR = 3.3, 95 % CI = 1.0 - 11.2,  $p = 0.047$ ), and smoked tobacco (unadjusted OR = 3.9, 95 % CI = 1.3 - 11.5,  $p = 0.011$ ) or being passive smoking (unadjusted OR = 2.0, 95 % CI = 1.0 - 5.6,  $p = 0.049$ ) were more likely to have HPV infection. Finally, women with other STDs were 6.9 more likely (95 % CI = 1.4 - 22.7,  $p = 0.016$ ) to be HPV-infected.

The categories 'previous type 2 diabetes' and 'vitamin supplementation' were not found to be associated with HPV

infection (Table 1). Overall energy-adjusted antioxidant intakes were not associated with HPV infection (Table 2). However, energy-adjusted retinol and lycopene intakes tended to be higher in controls than in cases (OR = 0.95, 95 % CI = 0.8- 1.0,  $p = 0.080$ ; OR = 0.99, 95% CI = 0.999 - 1.000,  $p = 0.074$  respectively). Women with higher TAC were less likely to have HPV infection (OR = 0.05, 95% CI = 0.01-0.5,  $p = 0.013$ ).

### Biological plausible variables to HPV infection

The variables with OR ≠ 1 and  $p \leq 0.2$  selected for simple logistic regression analysis and with biological plausibility for the risk of HPV infection were number of pregnancies, number of sexual partners, total annual sexual partners, use of oral contraceptives for  $\geq 6$  years, active tobacco smoking, passive smoking, other STDs, and energy, retinol and lycopene intakes, and TAC (Table 3).

### Generation of models

The stepwise analysis generated Model 1 shown in Table 4. Women with more pregnancies (adjusted OR = 5.5, 95 % CI = 1.2 - 28.1,  $p = 0.029$ ) and those with more sexual partners and total annual sexual partners remained in the model, and were more likely to have HPV infection. In contrast, higher consumption of energy-adjusted lycopene (adjusted OR = 0.96, 95 % CI = 0.95 - 0.99,  $p = 0.019$ ) reduced the risk of HPV infection in these women. No interaction ( $p \leq 0.05$ ) or collinearity ( $r < 0.8$ ) was found between the independent variables.

The stepwise analysis also produced Model 2, and the variables which remained were number of pregnancies, total annual sexual partners and TAC (Table 5). The first two non-nutrient variables were also selected in Model 1. Here, higher TAC status (adjusted OR = 0.05, 95 % CI = 0.03 - 0.7,  $p = 0.024$ ) was related to a reduced risk of HPV infection in participants. Again, no interaction ( $p \leq 0.05$ ) or collinearity ( $r < 0.8$ ) was found between the independent variables, though linearity was observed in the natural logarithm of HPV infection [ $P / 1-P$ ] vs. TAC when this latter was considered as a categorical variable. A value for TAC above 1.30 mmol/L decreased the probability of HPV infection.

## DISCUSSION

A high risk of HPV infection in women with high parity was observed in this study. Mukhopadhyay (2019) also published the association between HPV infection and increased parity in 171 women. It was suggested that in multiparous women, increased hormone levels may result in exposing the ectocervix for a longer period, and the impaired immune response facilitates the settlement of HPV infection. However, de Farias *et al.* (2021) did not find this association ( $p < 0.05$ ) in women older than 25 years old from a total of 428 participants. Similarly, Liang *et al.* (2018) and Pandey *et al.* (2019) published the same finding in 198 and 101 women, respectively. Although de Farias *et al.* (2021) did not argue their results, the last two attributed to their small sample size, the lack of association.

Table 1. Comparison of the characteristics of the participants with HPV-infection, controls and cases.  
 Tabla 1. Comparación de las características de los participantes con infección por HPV, controles y casos.

Variable	Controls (n = 66)	Cases (n = 33)	OR (95 % CI)	<sup>c</sup> p-value
<sup>a</sup> Age (years) (matched factor)	42.2 (± 8.1)	41.0 (± 7.8)	0.66 (0.40 - 1.09)	0.106
<sup>a</sup> Weight (kg)	73.7 (± 13.2)	71.2 (± 13.8)	0.98 (0.94 - 1.01)	0.303
<sup>a</sup> Height (cm)	1.59 (± 0.058)	1.60 (± 0.06)	0.82 (0.001 - 800.5)	0.956
<sup>a</sup> BMI	28.9 (± 5.04)	27.7 (± 5.12)	0.95 (0.87 - 1.04)	0.317
<b>Demographic data</b>				
<sup>b</sup> Marital Status				
Married	45 (68.2 %)	23 (69.7 %)	1.0	
Single/Divorced/Widow	21 (31.8 %)	10 (30.3 %)	0.81 (0.30 - 2.10)	0.678
<sup>b</sup> Occupation				
Manual labor/Retired/Professional/Merchant	33 (50 %)	16 (48.5 %)	1.0	
Housewife	33 (50 %)	17 (51.5 %)	1.10 (0.45 - 2.7)	0.822
<sup>b</sup> Socioeconomic Status				
Wealthy	19 (28.8 %)	12 (36.4 %)	1.0	
Average standard of living	18 (27.3 %)	7 (21.2 %)	0.51 (0.15 - 1.8)	0.296
Below average standard of living	19 (28.8 %)	6 (18.2 %)	0.41 (0.11 - 1.51)	0.184
Lowest average standard of living	10 (15.2 %)	8 (24.2 %)	1.31 (0.40 - 4.3)	0.652
<sup>b</sup> Biological data				
Age at menarche				
≥ 12 years	50 (75 %)	21 (63.7 %)	1.0	
< 12 years	16 (25 %)	12 (36.4 %)	1.69 (0.71 - 4.0)	0.235
<sup>b</sup> Lifestyle				
Number of previous pregnancies				
0 - 1	45 (68.2 %)	9 (27.3 %)	1.0	
> 1	21 (31.8 %)	24 (72.7 %)	6.1 (2.0 - 18.1)	0.001
Age at first sexual intercourse				
≥ 18 years	50 (76 %)	22 (67 %)	1.0	
< 18 years	16 (24 %)	11 (33 %)	1.7 (0.62 - 4.49)	0.308
Number of sexual partners				
0 - 1	50 (75 %)	18 (55 %)	1.0	
> 1	16 (25 %)	15 (45 %)	2.4 (1.0 - 6.08)	0.048
Total annual sexual partners				
0 - 1	50 (76 %)	10 (30 %)	1.0	
> 1	16 (24 %)	23 (70 %)	5.9 (2.2 - 16.1)	0.001
Use of condom alone and other methods (Intrauterine device, injection, vasectomy, rhythm, tablets)				
No	37 (56 %)	20 (60 %)	1.0	
Yes	29 (44 %)	13 (40 %)	0.79 (0.31 - 2.0)	0.636
Oral contraceptives for ≥ 6 years.				
No	56 (85 %)	22 (67 %)	1.0	
Yes	10 (15 %)	11 (33 %)	3.3 (1.01 - 11.2)	0.047
Active tobacco smoking				
No	60 (91 %)	22 (67 %)	1.0	
Yes	6 (9 %)	11 (33 %)	3.9 (1.3 - 11.5)	0.011
Passive smoking				
No	45 (68 %)	16 (49.5 %)	1.0	
Yes	21 (32 %)	17 (51.5 %)	2.036 (1.0 - 5.6)	0.049
Disease				
Other STDs				
No	63 (95 %)	25 (76 %)	1.0	
Yes	3 (5 %)	8 (24 %)	6.9 (1.4 - 22.7)	0.016
Previous type 2 diabetes				
No	57 (86 %)	27 (82 %)	1.0	
Yes	9 (14 %)	6 (18 %)	1.4 (0.4 - 4.6)	0.542
Vitamin-Supplementation				
Yes	50 (76 %)	27 (82 %)	1.0	
No	16 (24 %)	6 (18 %)	0.5 (0.17 - 1.8)	0.366

<sup>a</sup>Mean values with standard deviation

<sup>b</sup>Number of participants and percentage

<sup>c</sup>Conditional logistic regression analysis

OR = Odds Ratio; BMI = Body Mass Index; STDs = Sexual Transmitted Diseases; OR = Odds ratio; CI = 95 % Confidence Interval; p = Significant level  $p < 0.05$ .

**Table 2.** Association of nutrient antioxidants intake and TAC with HPV-infection in controls and cases.

**Tabla 2.** Asociación de la ingesta de nutrientes antioxidantes, y TAC con infección por HPV en controles y casos.

<sup>a</sup> Dietary nutrients	Controls (n = 66)	Cases (n= 33)	OR (CI)	<sup>c</sup> p - value
Energy (kcal/d)	2040 (1875.8 - 2305.5)	1710 (1579.6 - 1833.9)	0.998 (0.97 - 0.99)	0.025
Vitamin C (mg/d)	136.8 (110.2 - 154.5)	122.7 (89.3 - 167.8)	1.0 (0.99 - 1.0)	0.889
Vitamin A (RE/d)	761.0 (634.5 - 850.9)	673.5 (577.3 - 784.8)	1.0 (0.99 - 1.0)	0.745
Retinol (µg/d)	266.5 (222.2 - 304.7)	259.9 (187.8 - 334.8)	0.95 (0.8 - 1.0)	0.080
α-carotene (µg/d)	1015.5 (928.4 - 1052.4)	976.6 (792.7 - 1030.7)	1.0 (0.99 - 1.01)	0.889
β-carotene (µg/d)	3840.2 (3215.1 - 4236.8)	3561.4 (2995.9 - 4314.4)	0.99 (0.99 - 1.0)	0.207
β-cryptoxanthin (µg/d)	288.3 (195.6 - 325.8)	300 (193.1 - 380.3)	1.0 (0.99 - 1.00)	0.251
Lycopene (µg/d)	3350.9 (2665.6 - 4233.7)	2692.5 (1845 - 3838.6)	0.97 (0.95 - 1.0)	0.079
Lutein-zeaxanthin (µg/d)	1501.8 (1190.3 - 2108)	1475.2 (850-2238.2)	0.9 (0.999 - 1.000)	0.712
Vitamin E (mg/d)	5.6 (5.1 - 6.4)	5.0 (4.1 - 5.5)	1.03 (1.0 - 1.05)	0.012
α-tocopherol (mg/d)	5.6 (5.1 - 6.2)	5.0 (4.0 - 5.5)	1.05 (1.0 - 1.09)	0.013
β-tocopherol (mg/d)	0.17 (0.15 - 0.20)	0.13 (0.10 - 0.21)	18.4 (0.12 - 2.7)	0.253
γ-tocopherol (mg/d)	4.14 (3.3 - 5.4)	3.9 (3.3 - 5.1)	0.94 (0.81 - 1.1)	0.504
<sup>b</sup> Blood nutrients				
TAC (mmol/L)	1.39 (0.29)	1.21 (0.25)	0.06 (0.01-0.6)	0.013

<sup>a</sup>Median values and interquartile range. Nutrients were energy-adjusted by the residual method

<sup>b</sup>Mean values with standard deviation

<sup>c</sup>Conditional logistic regression analysis

OR = Odds Ratio; TAC = Total Antioxidant Capacity in plasma; p = Significant level  $p < 0.05$ .

**Table 3.** Plausible biological variables selected by simple logistic regression analysis.

**Tabla 3.** Variables biológicas plausibles, seleccionadas mediante análisis de regresión logístico simple.

HPV infection	OR	95 % CI	<sup>b</sup> p-value
Number of previous pregnancies	6.1	2.0 - 18.1	0.001
Number of sexual partners	2.4	1.0 - 6.1	0.048
Total annual sexual partners	5.9	2.2 - 16.1	0.001
Oral contraceptives for ≥ 6 years.	3.3	1.0 - 11.2	0.047
Active tobacco smoking	3.9	1.3 - 11.5	0.011
Passive smoking	2.04	1.0 - 5.6	0.049
Other STDs	6.9	1.4 - 22.7	0.016
<sup>a</sup> Energy (kcal/d)	0.99	0.97 - 0.99	0.016
<sup>a</sup> Retinol (µg/d)	0.9	0.8 - 1.0	0.080
<sup>a</sup> Lycopene (µg/d)	0.97	0.95 - 1.0	0.079
TAC (mmol/L)	0.05	0.01 - 0.5	0.013

<sup>a</sup>Nutrients were energy-adjusted by the residual method

<sup>b</sup>Simple logistic regression analysis

OR = Odds Ratio; CI = 95 % Confidence Interval; STDs = Sexual Transmitted Diseases; TAC = Total Antioxidant Capacity in plasma; p = Significant level  $p < 0.05$ .

**Table 4.** Factors associated with HPV-infection identified by conditional multiple logistic regression (Model 1).

**Tabla 4.** Factores asociados con la infección por HPV, identificados mediante regresión logística múltiple condicionada (Modelo 1).

Variable	SE	OR	95 % CI	p-value
Number of previous pregnancies	4.6	5.5	1.2 - 28.1	0.029
Number of sexual partners	9.7	10.8	2.9 - 58.7	0.01
Total annual sexual partners	4.9	5.9	1.5 - 25.5	0.023
<sup>a</sup> Lycopene (µg/d)	0.003	0.96	0.95 - 0.99	0.019

<sup>a</sup>Antioxidant nutrients were energy-adjusted by the residual method

SE = Standard Error; OR = Odds Ratio; CI = 95 % Confidence Interval; p = Significant level  $p < 0.05$ .

**Table 5.** Factors associated with HPV-infection identified by conditional multiple logistic regression (Model 2).

**Tabla 5.** Factores asociados con la infección por HPV, identificados por regresión logística múltiple condicionada (Modelo 2).

Variable	SE	OR	95 % CI	p - value
Number of previous pregnancies	7.63	9.26	1.88 - 45.44	0.01
Total annual sexual partners	4.16	6.45	1.82 - 22.85	0.01
TAC (mmol/L)	0.065	0.05	0.03 - 0.7	0.024

SE = Standard Error; OR = Odds Ratio; CI = 95 % Confidence Interval; TAC= Total Antioxidant Capacity in plasma; p = Significant level  $p < 0.05$ .

Women with more sexual partners and annual sexual partners were at higher risk of HPV infection. Itarat *et al.* (2019) found that women (n = 349) with multiple sexual partners had a higher risk of HPV as compared with those with limited sexual partners. However, authors recognized that lack of information about the HPV duration and sexual behavior of the partners of the recruited women was a limitation to provide a better conclusion.

The consumption of lycopene and a better TAC reduced the risk of HPV infection in our study. No association was found between the consumed antioxidants and those in plasma (data not shown), and it was observed that nutrient antioxidant supplementation was similar ( $p = 0.496$ ) in both groups. Pellegrini *et al.* (2018) concluded that different studies explain the reasons to understand the limitation to recognize the plasma TAC as a biomarker of dietary antioxidant intake. One of them is that antioxidants in plasma may influence the antioxidant compounds in other biological fluids; and second, the little understanding of the high inter-individual variability given by TAC assays, as a result of the unnoticed contribution by antioxidant enzymes. On the other hand, Barchitta *et al.* (2020) reported that 251 women with high antioxidants intake (zinc, selenium, manganese, vitamin A, vi-

tamin C, vitamin E, carotenoid, and flavonoids) were at lower risk of HPV infection. A recent review by Ono *et al.* (2020) described that intake of vitamins A, D and carotenoids such as lycopene, may inhibit early events of cervical cancer from HPV infection, but the mechanisms of action remain unclear. On the other hand, Lin *et al.* (2021) reported that women with the lowest antioxidant serum levels had a higher risk of HPV infection from 11,070 women aged 18 - 59 who participated in the 2003 - 2016 National Health and Nutrition Examination Survey in USA.

## CONCLUSION

Women with more pregnancies and sexual partners were at higher risk of HPV infection. On the other hand, higher dietary consumption of lycopene and TAC in blood reduced the risk of HPV infection in this study. The strength of this research lies in its matched case-control design, all the study variables explored, and the information generated about a largely unexplored topic in a Mexican population. However, the sample size and the absence of information on the role of male partners in HPV infection transmission were a limitation of this study. On the other hand, although the sexual intercourse at early age was not associated to HPV infection, a high percentage of our participant women reported had sexual intercourse before the age of 18. This finding may lead to the National Ministry of Health to look over the valid cervical cancer standards to lower the age for the HPV infection diagnosis in Mexican women. Strengthening both the sexual education and the increase of antioxidants consumption in women, at least at local level, to prevent the development of cervical cancer should be carried out.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the women who participated in this study, as well as Elizabeth Carillo, MD, Mrs. Alma América Ariyoshi Soto, and Mrs. Alma Angélica Ojeda, for their logistical and technical support. We also thank the "Agrupación George Papanicolau" and the ISSSTESON Hospital for the facilities provided to perform this study.

## REFERENCES

- Barchitta, M., Maugeri, A., La Mastra, C., La Rosa, M. C., Favara, G., Magnano San Lio, R. and Agodi, A. 2020. Dietary antioxidant intake and human papillomavirus infection: evidence from a cross-sectional study in Italy. *Nutrients* 12, 1384.
- Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Collado, J. J., Gómez, D., Muñoz, J., Bosch, F. X. and De Sanjosé, S. 2021. Human Papillomavirus and Related Diseases Report.
- CDC. Overweight & Obesity. Defining Adult Overweight & Obesity. <https://www.cdc.gov/obesity/basics/adult-defining.html>. June 3, 2022
- De Farias, K. F., Silva, A. S. G., Dos Santos, A. C. M., Da Silva, A. F., Da Silva, D. M., De Moura, E. L., De Moura Araújo, A. W., Nascimento, C. A., Martins, D. B. G. and De Souza Figueiredo, E. V. M. 2021. Human papillomavirus infection and risk factors to cervical cancer in asymptomatic women in the region of the Northeast of Brazil. *Journal of Health & Biological Sciences* 9, 1-6.
- Georgescu, S. R., Mitran, C. I., Mitran, M. I., Caruntu, C., Sarbu, M. I., Matei, C., Nicolae, I., Tocut, S. M., Popa, M. I. and Tampa, M. 2018. New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *Journal of Immunology Research* 2018, 5315816.
- Herrera-Ortiz, A., Conde-Glez, C. J., Olamendi-Portugal, M. L., García-Cisneros, S., Plett-Torres, T. and Sánchez-Alemán, M. A. 2018. College women, HPV genotyping and sexual behavior before HPV vaccination: Results from samples stored for a long time. *Journal of Infection and Public Health* 11, 286-289.
- Itarat, Y., Kietpeerakool, C., Jampathong, N., Chumworathayi, B., Kleebkaow, P., Aue-Aungkul, A. and Nhokaew, W. 2019. Sexual behavior and infection with cervical human papillomavirus types 16 and 18. *International journal of women's health* 11, 489.
- Jordá, G. B., Ramos, J. M., Mosmann, J., Lopez, M. L., Wegert, A. and Cuffini, C. 2020. Prevalencia del virus papiloma humano y factores de riesgo asociados en mujeres afiliadas al seguro de salud estatal en Posadas, Misiones (Argentina). *Revista chilena de infectología* 37, 111-116.
- Jozanov-Stankov, O., Đurić, J., Dobutovic, B. and Isenovic, E. 2009. Determination of total antioxidant status (TAS) as a biochemical parameter in control of workers' health. *Archives of Biological Sciences* 61, 375-382.
- Liang, X., Carroll, X., Zhang, W., Zhang, W., Liu, G., Li, S. and Leeper-Woodford, S. 2018. Socioeconomic and lifestyle factors associated with HPV infection in pregnant women: a matched case-control study in Beijing, China. *Reprod Health* 15, 200.
- Lin, H.-Y., Fu, Q., Kao, Y.-H., Tseng, T.-S., Reiss, K., Cameron, J. E., Ronis, M. J., Su, J., Nair, N. and Chang, H.-M. 2021. Antioxidants Associated With Oncogenic Human Papillomavirus Infection in Women. *The Journal of infectious diseases* 224, 1520-1528.
- López-Romo, H. Los Niveles Socioeconómicos y la distribución del gasto. [Consultado] 2009. Disponible: <http://edu.knowpad.com.mx/articulos/NivelSocioeconomicoAMAI.pdf>.
- Mcmullin, J. 2009. Experiencing Diagnosis. Views from Latina Cervical Cancer Patients. In: *Confronting Cancer. Metaphors, Advocacy, and Anthropology*. First Edition, 63-82. Santa Fe, New Mexico, USA.
- Mukhopadhyay, S. 2019. A demographic and clinico pathological study of HPV associated cofactors in the pathogenesis of cervical cancer. *Indian J Obstet Gynecol Res* 6, 472-479.
- Ono, A., Koshiyama, M., Nakagawa, M., Watanabe, Y., Ikuta, E., Seki, K. and Oowaki, M. 2020. The preventive effect of dietary antioxidants on cervical cancer development. *Medicina* 56, 604.
- PAHO. Section 2. Summary of available HPV tests. [Consultado June 10, 2019] 2019. Disponible: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=incorporacion-de-la-prueba-del-vph-en-programas-de-prevencion-de-cancer-cervicouterino&alias=36310-manual-vph-resumen-pruebas-disponibles-evidencia-cientifica-310&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=incorporacion-de-la-prueba-del-vph-en-programas-de-prevencion-de-cancer-cervicouterino&alias=36310-manual-vph-resumen-pruebas-disponibles-evidencia-cientifica-310&Itemid=270&lang=es).



- Pandey, D., Solleti, V., Jain, G., Das, A., Shama Prasada, K., Acharya, S. and Satyamoorthy, K. 2019. Human Papillomavirus (HPV) Infection in Early Pregnancy: Prevalence and Implications. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2019, 5.
- Pellegrini, N., Vitaglione, P., Granato, D. and Fogliano, V. 2018. Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: merits and limitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100, 5064-5078.
- Quizán-Plata, T. and Ortega, M. I. 2000. Design and validation of a tool to identify dietary risk in low-income adult women. *Nutrición Clínica* 3, 128-135.
- Romieu, I., Parra, S., Hernández, J. F., Madrigal, H., Willett, W. and Hernández, M. 1999. Questionnaire Assessment of Antioxidants and Retinol Intakes in Mexican Women. *Archives of Medical Research* 30, 224-239.
- Secretaría De Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. [Consultado September 30, 2019 2019] 2016. Disponible: <https://www.gob.mx/salud/documentos/encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-de-medio-camino-2016>.
- Soto-Fuenzalida, G. A., Hernández-Hernández, J. A., Del Carmen López-Sánchez, R., Aguayo-Millán, C. D., Villela-Martínez, L. M., Espino-Rodríguez, M., Niño-Parra, V. E. and Ortiz-López, R. 2020. Tipificación de serotipos del virus del papiloma humano de alto riesgo. *Ginecología y obstetricia de México* 88, 659-666.
- WHO. Cervical Cancer. [Consultado June, 2022 2022] 2022. Disponible: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>.
- Willett, W. (1998) *Nutritional epidemiology*, New York, Oxford University Press.
- Winer, R. L., Hughes, J. P., Feng, Q., O'reilly, S., Kiviat, N. B., Holmes, K. K. and Koutsky, L. A. 2006. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *The New England Journal of Medicine* 354, 2645-2654.



# Confiabilidad del hisopado de piel y muestra de orina para detectar fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en Sonora usando PCR en punto final en pacientes hospitalizados

Cutaneous Swab and Urine Samples Reliability to Detect *Rickettsia rickettsii* through PCR in hospitalized patients, Sonora

Cynthia Yadira García-Cortez<sup>1</sup>, Gerardo Álvarez Hernández<sup>1\*</sup>, Enrique Bolado Martínez<sup>2</sup>, Maria del Carmen Candia Plata<sup>1</sup>, Miguel Ángel Martínez Medina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>3</sup> Área de Enseñanza e Investigación, Hospital Infantil del Estado de Sonora. Calle Reforma 355. Colonia Ley 57. CP. 83100. Hermosillo, Sonora, México.

## RESUMEN

La determinación de anticuerpos IgM e IgG por inmunofluorescencia indirecta es la prueba estándar para confirmar la fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* (FMRR), aunque tiene limitado valor clínico pues requiere tres semanas para ser confiable. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una opción para el diagnóstico en sangre total, pero hay menos certidumbre respecto a su capacidad al usar muestras de orina y tejido. Nos proponemos estimar la confiabilidad de PCR en muestras de hisopado cutáneo y orina en pacientes sospechosos de FMRR, comparándole con resultados de PCR en muestras de sangre total. Se analizaron muestras de 110 pacientes sospechosos de FMRR atendidos en hospitales de Sonora, entre septiembre de 2018 y octubre de 2019. El cálculo de la confiabilidad se realizó mediante el Coeficiente de Kappa (K). Se detectó *R. rickettsii* en 21 muestras de orina, encontrando una concordancia sustancial (K = 0.607, IC 95 % (0.385, 0.844)); en tanto, 3 hisopados cutáneos resultaron positivos, pero sin significancia estadística (K = 0.417, IC95 % (- 0.338, 1.172)). Nuestros hallazgos sustentan que la PCR en orina es una técnica confiable para confirmar la sospecha clínica de FMRR en pacientes hospitalizados.

**Palabras clave:** Fiebre manchada de las Montañas Rocosas, PCR, detección temprana de la enfermedad, confiabilidad.

## ABSTRACT

Rocky Mountain spotted fever (RMSF) is an infectious disease confirmed through IgM and IgG determination obtained by indirect immunofluorescence, although it has limited clinical value since it requires up to three weeks to be reliable. Polymerase Chain Reaction (PCR) is an alternative for RMSF diagnosis in whole blood, but there is less certainty regarding its certainty when urine and tissue samples are used. This study aimed to estimate the reliability of PCR in skin swab and urine samples obtained from patients with suspected RMSF, comparing it with PCR results from whole blood samples. Samples from 110 suspected RMSF hospitalized patients, between September 2018 and October 2019, were analyzed. Reliability was calculated using the Kappa

Coefficient (K). *R. rickettsii* was detected in 21 urine samples, finding substantial agreement (K = 0.607, 95 % CI (0.385, 0.844)); meanwhile, 3 skin swabs were positive, but without statistical significance (K = 0.417, 95 % CI (- 0.338, 1.172)). Our findings support that urine PCR is a reliable technique to confirm clinical suspicion of RMSF in hospitalized patients. **Key words:** Rocky Mountain spotted fever, PCR, early detection of disease, reliability.

## INTRODUCCIÓN

La fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* (FMRR) es una enfermedad reemergente en Sonora. Es un padecimiento transmitido al humano por artrópodos vectores infectados, en México la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* es el principal vector de la enfermedad (Eremeeva *et al.*, 2015). La FMRR constituye una amenaza médica cuando no es tratada oportunamente al asociarse a una elevada letalidad, que oscila en Sonora entre 20 y 40 % (Álvarez *et al.*, 2015). Históricamente, en la región su presencia está ligada a determinantes biológicos y sociales, que explican la ocurrencia de casos y brotes durante todo el año (Álvarez y Contreras, 2013).

La sospecha temprana de FMRR se complica por la poca especificidad del cuadro clínico inicial, que semeja a otros padecimientos endémicos de la región como dengue e influenza (Álvarez *et al.*, 2017). La confirmación diagnóstica puede establecerse hasta cuatro semanas posteriores al inicio sintomático al identificar una cuadruplicación en los títulos de anticuerpos IgM e IgG por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (La Scola y Raoult, 1997; Biggs *et al.*, 2016). La IFI es la prueba estándar para confirmar FMRR, pero es menos útil clínicamente, pues cuando los títulos de IgM e IgG son evidencia confirmatoria el paciente se ha recuperado o ha fallecido.

Una técnica alternativa para confirmar FMRR es la reacción en cadena de polimerasa (PCR), pues es un método válido y más temprano para confirmar la sospecha en muestras de sangre total (Bechah *et al.*, 2011; Santibáñez *et al.*, 2013; Oteo *et al.*, 2014). Sin embargo, es menos claro su desempeño en otras muestras biológicas como el hisopado

cutáneo y orina, que además de ser menos invasivas, sean oportunas para la toma de decisiones médicas de esta enfermedad, como ha sido documentado en otros padecimientos con similar expresión clínica como fiebre Zika (Gourinat *et al.*, 2015), leptospirosis (Bal *et al.*, 1994) y tuberculosis (Gopinath y Singh, 2009).

La presente investigación explora la confiabilidad clínica del hisopado cutáneo y la orina obtenidos de pacientes sospechosos de FMRR que fueron atendidos en hospitales públicos de Sonora, mediante la técnica de PCR en punto final. El estudio pretende generar resultados que mejoren la capacidad diagnóstica de la FMRR a nivel regional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante un diseño transversal se estimó la confiabilidad de muestras de hisopado cutáneo y de orina de pacientes hospitalizados por sospecha clínica de FMRR, utilizando la PCR en punto final para identificar *Rickettsia rickettsii*. Los pacientes fueron atendidos en hospitales públicos de Sonora entre el 20 de septiembre de 2018 y el 31 de octubre de 2019. Para examinar la capacidad diagnóstica de PCR en ambas muestras, se empleó como método estándar la determinación de PCR en muestras sanguíneas obtenidas de los mismos pacientes. El estudio recibió aprobación por parte de un comité de ética en investigación acreditado.

### Tipo y tamaño de la muestra

La muestra del estudio constó de 110 sujetos que recibieron atención médica en los sitios de estudio; de ellos, 79 (71.8 %) fueron sospechosos de FMRR (Grupo I), y fueron comparados con 31 (28.2 %) pacientes con cuadro febril infeccioso agudo de al menos de 5 días de evolución, pero sin sospecha del diagnóstico de interés (Grupo II). Para ser elegibles, los pacientes de ambos grupos firmaron una hoja de consentimiento informado o de asentimiento en el caso de menores de edad.

Los procedimientos para obtener las muestras biológicas fueron: para hisopado cutáneo, la lesión maculopapular, vesícula o escara fue humedecida con una gasa embebida en solución salina estéril, y un hisopo de dacrón o rayón estéril se giró vigorosamente, entre cinco y seis veces en un ángulo de 50° a 60°, en la base de la lesión y se retiró la costra cuando fue posible, sin lastimar al paciente; posteriormente el hisopo se colocó en tubo estéril de plástico con solución salina estéril y con tapa (InDRE- Lineamientos Rickettsiosis, 2017). La muestra de orina se tomó directamente del chorro urinario (20 a 30 mL), en un contenedor estéril etiquetado para su identificación. La orina colectada fue examinada durante las primeras 24 h, tal como es recomendado (Salinas, 2008).

### Procesamiento de las muestras

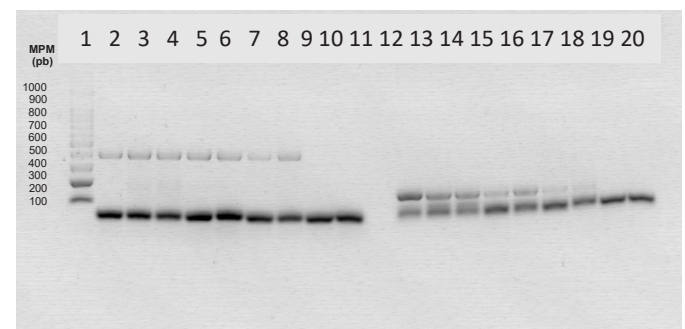
Se utilizó el equipo automatizado Magna Pure Compact LC 2.0 de Roche® para la extracción del ADN. Las muestras recibieron pretratamiento: la orina se centrifugó por 30 min a 4,000 rpm para tomar 200 µL del sedimento; se tomaron 200 µL de sangre y se incubó 30 min con 20 µL

de proteinasa K. Al final de la extracción de ácidos nucleicos se obtuvieron 200 (µL) de ADN eluido. La integridad del ADN fue examinada mediante la nitidez de las bandas de amplificación derivadas de la electroforesis.

Para confirmar el género *Rickettsia* se preparó mezcla de reacción para identificar el gen *gltA* y otra para determinar la especie *rickettsii*, identificando el gen de la proteína hipotética A1G\_04230; se utilizó el termociclador Bio-Rad ICycler. Las mezclas contenían: iniciadores CS-1(F) (5'-GCA-AGTATCGGTGAGGATGTAAT-3) y CS-2(R) (5'-GCTTCCTAAA-ATTCAATAATCAGGAT-3) (0.8 µM), diseñados para amplificar un fragmento de 401 pares de bases (pb) del gen citrato sintasa (*gltA*) para *Rickettsia* (Labruna *et al.*, 2004) y los iniciadores RRi1(F) (5'-AAATCAACGGAAGAGCAAAAC-3) y RRi2(R) (5'-CCCTCCACTACTGCATCAT-3) (0.8 µM), para un fragmento de 153 pb de la proteína A1G\_04230 para *rickettsii* (Kato *et al.*, 2012); agregando en ambas reacciones, MgCl<sub>2</sub> (3 mM), oligonucleótidos (200 µM), buffer 5X, Taq ADN polimerasa (0.5 U) y 5 µL de ADN extraído de la muestra, para una reacción de 25 µL. Se utilizó control positivo (ADN de *Rickettsia rickettsii*), control negativo (ADN de paciente sin FMRR) y agua destilada estéril para el blanco de PCR (Kato *et al.*, 2013).

Las condiciones de termociclado para género fueron: 1 ciclo a 95 °C por 5 min, 40 ciclos a: 95 °C por 15 s, 52 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y un ciclo a 72 °C por 10 min (Labruna *et al.*, 2004). Las condiciones para especie fueron: 1 ciclo a 95 °C por 5 min, 40 ciclos a: 95 °C por 15 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y un ciclo a 72 °C por 10 min, conservando los productos a -20 °C (Kato *et al.*, 2013).

Se realizó electroforesis a los productos de amplificación en gel de agarosa al 2 % (p/v) en buffer TBE 1X (Tris 50 mM, ácido bórico 40 mM, EDTA 0.5 M), con el colorante Gel Star dilución 1:10 (Lonza U.S.A.), a 80 V por 60 min. Se utilizó marcador de 100 pares de bases (pb) (Promega, U.S.A.) (Figura 1).



Carril 1: Marcador de 100 pb; carril 2: control positivo a género gen *gltA* (401 pb); carril 3 y 4: muestra de sangre positiva a género; carril 5 y 6: muestra de orina positiva a género; carril 7 y 8: muestra de hisopado de piel positiva a género; carril 9: control negativo de PCR; carril 10: blanco de PCR; carril 11: sin muestra; carril 12: control positivo a especie gen de la proteína A1G\_04230 (153 pb); carril 13 y 14: muestra de sangre positiva a especie; carril 15 y 16: muestra de orina positiva a especie; carril 17 y 18: muestra de hisopado de piel positiva a especie; carril 19: control negativo de PCR; carril 20: blanco de PCR. MPM: marcador de peso molecular.

**Figura 1.** Bandas de amplificación de los genes *gltA* y proteína A1G\_04230. Figure 1. Amplification bands of the *gltA* and A1G\_04230 protein genes.

### Plan de análisis

Se obtuvieron frecuencias relativas de las variables clínicas y sociodemográficas de los sujetos de estudio, y fueron contrastadas de acuerdo con la muestra biológica que se obtuvo: 1) muestras de orina; 2) muestras de hisopado cutáneo; y 3) sujetos sin sospecha de FMRR. Para examinar las diferencias de las variables categóricas se utilizó la prueba de Chi-cuadrada para igualdad de proporciones; para las variables continuas se emplearon las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) o U de Mann-Whitney, de acuerdo con su distribución. En todos los casos, se probaron hipótesis de dos colas y valores de  $p \leq 0.05$  fueron juzgados estadísticamente significativos.

Para estimar la confiabilidad clínica de los resultados de la técnica de PCR en punto final en muestras de hisopado cutáneo y de orina, se contrastaron con los obtenidos en muestras de sangre total de los mismos sujetos de estudio. Se consideró positivo un resultado de PCR cuando se apreció una banda con un número de pares de bases acorde para cada uno de los genes amplificados (Fig. 1). La confiabilidad de la PCR se estimó mediante el coeficiente de Kappa de Cohen (K) (Cohen, 1960; Cerda-Lorca *et al.*, 2008), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$K = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}$$

Donde Pr (a) es el resultado de concordancia observada, y Pr (e) es el resultado de la concordancia ajustando el azar.

Para propósitos de interpretación del coeficiente de Kappa, se empleó la tabla de valores propuesta originalmente por Landis (Landis y Koch, 1977).

### RESULTADOS

En total se analizaron 110 muestras biológicas, 79 (71.8 %) de pacientes sospechosos de FMRR, de éstas, 72 (65.5 %) fueron orinas y 7 (6.4 %) hisopados cutáneos; en el grupo de comparación hubo 31 muestras de sangre. Entre las variables analizadas, se observó que la edad media de los casos sospechosos de FMRR fue menor que la del grupo de comparación ( $20.9 \pm 15.2$ ) y esta diferencia fue significativa ( $p = 0.002$ ).

Se observó que los pacientes con sospecha de FMRR tenían un mayor promedio de días transcurridos desde el comienzo de sus síntomas que los sujetos del grupo de comparación, en los pacientes a los que se les tomó muestra de orina, en promedio tenían  $6.2 \pm 3.3$  d, mientras en los de hisopado cutáneo la media fue de  $7.3 \pm 2.0$ . La media del grupo de comparación fue de  $3.8 \pm 2.2$ , esta diferencia también fue significativa ( $p < 0.001$ ). Otra variable significativamente diferente ( $p = 0.009$ ) fue la cuenta plaquetaria ( $\times 10^3$ ), con los pacientes de hisopado, mostrando los valores más bajos ( $41.25 \pm 30.55$ ) seguidos por los de muestra de orina ( $94.54 \pm 90.00$ ). Los detalles se muestran en la Tabla I.

Se observó que 23 de las 72 (31.9 %) muestras de orina analizadas tuvieron un resultado confirmatorio a infección por *rickettsia* y que 7 (30.4 %) de esos sujetos fallecieron, mientras 3 (6.1 %) murieron en el grupo de pacientes ( $n = 49$ ).

**Tabla I.** Condiciones de pacientes sospechosos de FMRR por tipo de muestra.  
**Table I.** Conditions of RRMF-suspected patients by sample type.

Condición	Pacientes con orina N (%) [n = 72]	Pacientes con Hisopado N (%) [n = 7]	Pacientes Gpo comparación N (%) [n = 31]	p <sup>1/</sup>
Muestras positivas	23 (31.94)	3 (42.85)	0 (0.0)	0.557
Edad (Media $\pm$ DS) &	$11.79 \pm 10.34$	$13.11 \pm 7.07$	$20.90 \pm 15.19$	0.002*
Defunciones	10 (13.8)	2 (28.57)	0 (0.0)	0.301
Días de evolución (media $\pm$ DS) <sup>A/</sup>	$6.16 \pm 3.32$	$7.28 \pm 1.97$	$3.77 \pm 2.21$	< 0.001*
Manejo del paciente <sup>f</sup>				
- Hospitalario	70 (97.22)	7 (100.0)	27 (87.09)	0.065
- Ambulatorio	2 (2.78)	0 (0.0)	4 (12.91)	
Cuadro Clínico <sup>g</sup>				
- Fiebre	72 (100.0)	7 (100.0)	31 (100.0)	1.000
- Exantema	55 (76.38)	5 (71.42)	18 (58.06)	0.096
- Malestar General	57 (79.16)	6 (85.71)	26 (83.87)	0.565
- Cefalea	65 (90.27)	7 (100.0)	29 (93.54)	0.720
- Plaquetas [ $\times 10^3 / \mu\text{L}$ ] (media $\pm$ DS) <sup>&amp;</sup>	$94.54 \pm 90.00$	$41.25 \pm 30.55$	$137.42 \pm 75.58$	0.009*
- Leucocitos [ $\times 10^3 / \mu\text{L}$ ] (media $\pm$ DS) <sup>&amp;</sup>	$9.42 \pm 5.54$	$10.12 \pm 5.71$	$8.44 \pm 7.61$	0.092
Localidad de residencia <sup>h</sup>				
- Rural	16 (22.23)	3 (42.86)	12 (38.70)	0.076
- Urbana	56 (77.77)	4 (57.14)	19 (61.29)	

& Basado en una prueba de ANOVA; # Basado en una prueba chi cuadrada; \* Estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95 %;

A/ Días de evolución desde el comienzo de los síntomas hasta la toma de la muestra



negativos a *R. rickettsii*, lo que fue estadísticamente diferente ( $p = 0.009$ ). También se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.007$ ) en el conteo de plaquetas ( $\times 10^3$ ), pues los sujetos positivos tuvieron un promedio inferior ( $58.82 \pm 56.17$ ) al compararlos con los pacientes con orina negativa ( $111.3 \pm 98.17$ ) (Tabla II). No se apreciaron diferencias significativas en las variables analizadas entre los pacientes del grupo de hisopado cutáneo.

Entre las 23 muestras de orina positivas, en 21 se confirmó infección por *R. rickettsii* y en otras dos se identificó al género *Rickettsia*, pero no a la especie. Al estimar el coeficiente de Kappa se alcanzó un valor de 0.615, con un IC 95 % (0.386, 0.8436). En cuanto a los 7 hisopados cutáneos analizados, en 3 (42.8 %) pacientes se confirmó infección por *R. rickettsii*; en este caso el coeficiente de Kappa fue de 0.417, aunque no tuvo significancia estadística.

Otra característica analizada fueron las diferencias en cuanto a la época del año en que la muestra fue obtenida, observándose que la mayor proporción ( $n = 38$ ; 52.7 %) de muestras se alcanzó durante el trimestre agosto-octubre, el de mayor temperatura y humedad ambiental, esta diferencia fue significativa ( $p < 0.001$ ); en este trimestre, el mayor porcentaje (50.0 %) de positividad ocurrió en septiembre (Figura 2). También apreciamos que la mayor proporción (77.5 %) de muestras correspondió a pacientes menores de 18 años, aunque la tasa de positividad (40.0 %) más elevada se encon-

tró en las muestras de niños menores de 5 años y los adultos jóvenes entre 19 y 30 años.

Finalmente, la mayor proporción de muestras positivas se apreció en los sujetos en quienes se tomó la muestra entre el sexto (70.0 %) y séptimo día (66.7 %) de evolución clínica, aunque el mayor volumen ( $n = 19$ ; 23.8 %) de muestras fue tomado en el quinto día, detectando en este, una positividad de 31.6 %. No obstante, se detectó infección rickettsial en la muestra de un paciente con 4 d de evolución de los síntomas.

## DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos sustentan que la prueba de PCR punto final en muestras de orina es una técnica confiable para confirmar la sospecha clínica de FMRR. Esto al compararse con el desempeño de la misma prueba en muestras de sangre total. También observamos que en orina es posible detectar la infección por *R. rickettsii* desde el 4° día de evolución clínica, un momento relativamente temprano de la enfermedad. La identificación de la bacteria en orina puede ser explicada por el daño renal que ocurre en pacientes con formas graves de FMRR que ameritan hospitalización, sea por la liberación sistémica de endotoxinas y la activación de la cascada inflamatoria o por la invasión directa de la bacteria al tejido renal (Stevens *et al.*, 2014; Kamath e Iyengar, 2017).

Es importante considerar la potencial ventaja de la muestra de orina sobre la muestra sanguínea para diagnosticar FMRR, pues se ha documentado que la sensibilidad de ensayos de PCR tradicionales en muestras de sangre total es del 80 % (Kato *et al.*, 2013). Es posible inferir que esta capacidad aumentaría a partir del sexto y séptimo días cuando el riñón tiene un mayor daño tisular (Bouatra *et al.*, 2013) y la etapa crítica de la enfermedad ha comenzado. Por ello, recomendamos nuevos estudios sobre el tópico, incrementando el tamaño de la muestra, considerando cuidadosamente los días de evolución clínica e integrando un control interno para incrementar la reproducibilidad y ensayar la técnica de PCR en tiempo real.

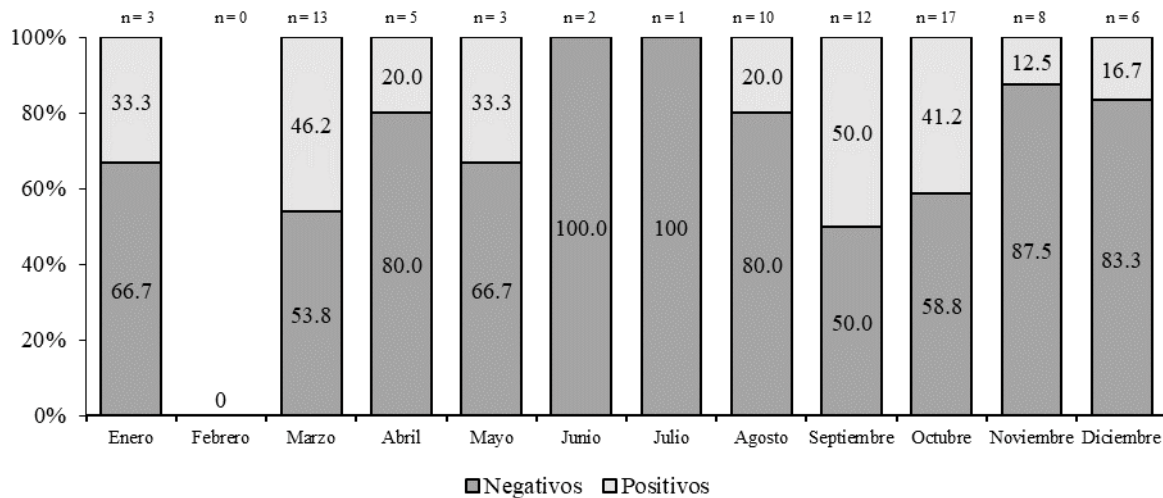
No tenemos antecedentes de estudios previos en México para evaluar la confiabilidad de PCR en muestras de orina para confirmar el diagnóstico de FMRR. Los hallazgos de esta investigación pueden ser utilizados como fundamento para incrementar la búsqueda de *R. rickettsii* en muestras de orina de pacientes con sospecha de FMRR. A la ventaja de que la recolección de la muestra de orina es menos invasiva y dolorosa que la de sangre total, debe considerarse que es superior en términos de oportunidad que la confirmación en muestras sanguíneas por IFI, que requiere que transcurran al menos tres semanas desde el comienzo de síntomas para detectar el incremento en los títulos de anticuerpos IgG (Oteo *et al.*, 2014; Biggs *et al.*, 2016). En el caso de Sonora, la mayor proporción de desenlaces fatales ocurre entre el séptimo y décimo (media 9.3 d) día de evolución (Álvarez *et al.*, 2021) por lo que sigue siendo una necesidad encontrar técnicas confiables para el diagnóstico de la enfermedad en su etapa inicial, pero PCR en muestras de orina parece ser una buena alternativa.

**Tabla II.** Condiciones de pacientes sospechosos de FMRR con muestra de orina positiva o negativa.

**Table II.** Conditions of RRMF-suspected patients with positive or negative sample.

Condición	Pacientes con Orinas positivas	Pacientes con Orinas negativas	P <sup>1/</sup>
	N (%) [n = 23]	N (%) [n = 49]	
Edad (media $\pm$ DS)	11.87 $\pm$ 10.08	11.73 $\pm$ 10.56	0.818
Defunciones	7 (30.43)	3 (6.12)	0.009*
Días de evolución (media $\pm$ DS) <sup>A/</sup>	6.86 $\pm$ 2.77	5.71 $\pm$ 3.37	0.159
Manejo del paciente <sup>#</sup>			
- Hospitalario	23 (100.0)	47 (95.91)	0.325
- Ambulatorio	0 (0.0)	2 (4.08)	
Cuadro Clínico <sup>#</sup>			
- Fiebre	23 (100.0)	49 (100.0)	1.000
- Exantema	20 (86.95)	34 (69.38)	0.147
- Malestar General	18 (78.26)	38 (77.55)	1.000
- Cefalea	20 (86.95)	43 (87.75)	1.000
- Plaquetas [ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ] (media $\pm$ DS) <sup>#</sup>	58.82 $\pm$ 56.17	111.3 $\pm$ 98.17	0.007*
- Leucocitos [ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ] (media $\pm$ DS) <sup>#</sup>	10.63 $\pm$ 5.60	8.97 $\pm$ 5.60	0.193
Localidad de residencia <sup>#</sup>			
- Rural	7 (30.43)	9 (18.36)	0.361
- Urbana	16 (69.56)	40 (81.63)	

& Basado en una prueba U de Mann-Whitney; # Basado en una prueba chi cuadrada; \* Estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95 %; A/ Días de evolución desde el comienzo de los síntomas hasta la toma de la muestra



$p < 0.0001^*$

**Figura 2.** Muestras de pacientes sospechosos de FMRR, según mes de la toma y resultado.

**Figure 2.** Samples from patients with suspected FMRR, according to the month of collection and result.

Respecto a la confiabilidad de PCR para confirmar FMRR en muestras de tejido obtenidas mediante hisopado cutáneo, se encontró que, aunque tiene una capacidad moderada de acuerdo con la escala propuesta por Landis (1977), no fue estadísticamente significativa, probablemente porque tuvimos un reducido número de pacientes que desarrollaron escaras, lo que limitó el poder estadístico de la muestra. A diferencia de otras rickettsiosis del grupo de fiebres manchadas, como en infecciones por *R. parkeri* o *R. massiliae*, la presencia de escaras, aunque posible en FMRR, es muy infrecuente (Walker *et al.*, 1981; Argüello *et al.*, 2012).

Por lo anterior, no tenemos evidencia que apoye la colecta rutinaria de tejidos mediante hisopado cutáneo para el diagnóstico de FMRR; sin embargo, en caso de identificarse una escara en pacientes con sospecha, alentamos a que se les tome hisopado cutáneo, pues como hemos documentado se identificó *R. rickettsii* en 3 hisopados cutáneos, uno de ellos en un paciente con resultado negativo en sangre, quien cursaba su tercer día de tratamiento con doxiciclina. No podemos descartar totalmente la potencial utilidad de PCR en este tipo de muestra biológica, pues ya otros investigadores (Bechah *et al.*, 2011) identificaron la bacteria utilizando esta técnica, especialmente en pacientes con más de seis días de evolución, cuando existe una mayor concentración de bacterias en la lesión o escara. En escenarios similares a Sonora, el hisopado de escaras puede contribuir a identificar otras especies de *Rickettsia* diferentes de *R. rickettsii*, como ha sido demostrado en otras regiones (Parola *et al.*, 2013).

Aunque no fue un objetivo del estudio, un hallazgo interesante es que fue más frecuente encontrar un resultado positivo en muestras tomadas entre las 14:00 y las 21:00 h, contrario a la recomendación de que el mejor momento para la toma de estas muestras sea por la mañana, cuando existe mayor carga de la bacteria (Kato *et al.*, 2016). No obstante, recomendamos que se lleven a cabo nuevos estudios regionales para concluir al respecto.

Se reconoce que la ocurrencia de FMRR es mayor cuando la temperatura y humedad ambientales se incrementan, favoreciendo el crecimiento, desarrollo, patrones de alimentación y multiplicación de las garrapatas *R. sanguineus* (Chen y Sexton, 2008; Parola *et al.*, 2018), esto es consistente con lo que observamos en nuestro estudio, pues la mayor proporción (21.3 %) de muestras sucedió en octubre y la mayor tasa de positividad (50.0 %) en septiembre, cuando la temperatura media es de 29 °C y el porcentaje de humedad relativa es superior al 30 % (CONAGUA, 2021), condiciones que se asocian a una mayor actividad alimentaria de la garrapata *R. sanguineus*, a incremento de transmisión e incluso, a la ocurrencia de formas más severas de rickettsiosis del grupo de fiebres manchadas (Dantas-Torres, 2008; Parola *et al.*, 2008). En este sentido, es recomendable efectuar en el corto plazo, investigaciones regionales para secuenciar los fragmentos de amplificación de DNA de *R. rickettsii* y correlacionarlos con la severidad de las manifestaciones clínicas.

Dada la poca especificidad de sus manifestaciones clínicas y la ventana de tiempo requerida, hasta 21 d, para confirmar mediante la prueba estándar, el diagnóstico de la FMRR permanece como un desafío. En este escenario, los ensayos moleculares de la PCR son la opción más promisoría para confirmar la sospecha diagnóstica de FMRR utilizando una variedad de muestras biológicas, incluyendo el hisopado cutáneo (Parola *et al.*, 2013). Una serie de factores, como la calidad del ADN extraído, la presencia de inhibidores de la PCR, la selección del blanco genético que se amplificará, el desempeño de los iniciadores y el grado de aprovechamiento del ensayo, pueden mermar la sensibilidad y la confiabilidad de la técnica. Por ello, se ha propuesto que el desarrollo de ensayos de PCR en tiempo real puede optimizar la capacidad diagnóstica de los métodos moleculares tradicionales, especialmente su sensibilidad, lo que tendría un impacto clínico muy favorable pues usando muestras de orina e hisopado

cutáneo, es posible disminuir a 4 d o menos el periodo para confirmar FMRR (Zemtsova *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

Las muestras de orina analizadas mediante PCR en punto final mostraron una sustancial confiabilidad para detectar infección por *Rickettsia rickettsii* en pacientes con sospecha clínica de FMRR, cuando se le contrasta con PCR en muestras sanguíneas. Por ello, se plantea que la muestra de orina es una opción útil para confirmar el diagnóstico de FMRR en pacientes hospitalizados, y puede emplearse en pacientes con vasculitis severa o con daño endotelial sistémico como la trombocitopenia, en los que hay dificultad para tomar una muestra sanguínea.

Considerando que la presencia de escaras en FMRR es muy rara, el hisopado cutáneo no parece ser una alternativa que deba emplearse rutinariamente ante este tipo de pacientes. Pero si es una opción que debe considerarse en Sonora cuando se detecten pacientes con sospecha de alguna fiebre manchada acompañada por el desarrollo de escaras, pues es posible identificar la infección por alguna *Rickettsia* diferente a *R. rickettsii*, lo que es factible pues hay evidencia de *R. parkeri* en garrapatas de la región (Delgado-de la Mora *et al.*, 2019).

Nuestros hallazgos pueden representar una línea basal para futuras investigaciones regionales respecto a la capacidad diagnóstica de la PCR en muestras biológicas como la orina y tejido recolectado mediante hisopado cutáneo, lo que es necesario pues la FMRR en Sonora se mantiene como una región de alta endemia y una elevada letalidad.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por permitirnos el uso de sus laboratorios, equipos e instrumentos del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud. Gracias a los hospitales públicos de Sonora por el apoyo en la obtención de las muestras. Nuestra gratitud a miembros del Departamento de Zoonosis Rickettsiales de los Centros de Prevención y Control de los Estados Unidos (CDC, Atlanta) por su apoyo técnico en el desarrollo de este estudio.

## REFERENCIAS

- Alvarez-Hernández G. y Soto-Contreras J.J. 2013. Letalidad por fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en pacientes de un hospital pediátrico del estado de sonora, 2004-2012. Salud Publica de México. 55(2):151-152.
- Alvarez-Hernandez G., Murillo-Benitez C., Del Carmen Candia-Plata M. y Moro M. 2015. Clinical profile and predictors of fatal Rocky Mountain spotted fever in children from Sonora, Mexico. Journal of Pediatric Infectious Diseases. 34(2):125-130.
- Álvarez-Hernández G., González-Roldán J.F., Hernández-Milán N.S., Lash R.R., Barton-Behravesh C. y Paddock C.D. 2017. Rocky Mountain spotted Fever in Mexico: past, present, and future. Lancet Infectious Diseases. 17 (6): e189-e196. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Alvarez-Lopez D.I., Ochoa-Mora E., Heitman K.N., Binder A.M., Álvarez-Hernández G. y Armstrong P.A. 2021. Epidemiology and clinical features of Rocky Mountain spotted fever from enhanced surveillance, Sonora, Mexico: 2015-2018. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 104 (1): 190-197.
- Argüello A.P., Hun L., Rivera P. y Taylor L. 2012. A fatal urban case of Rocky Mountain spotted fever presenting an eschar in San José, Costa Rica. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 87 (2): 345-348.
- Bal, A. E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R. A., De Meza-Brewster, J., Korver, H. y Terpstra, W. J. 1994. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology, 32(8), 1894-1898.
- Bechah Y., Socolovschi C. y Raoult D. 2011. Identification of rickettsial infections by using cutaneous swab specimens and PCR. Emerging Infectious Diseases. 17(1):83-86
- Biggs H.M., Behravesh C.B., Bradley K.K., Dahlgren F.S., Drexler N.A., Dumler J.S., et al. 2016. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States. MMWR Recommendations Reports Morbidity and Mortality Weekly Report [Internet]. 65(2):1-44.
- Bouatra S., Aziat F., Mandal R., Guo A.C., Wilson M.R., Knox C., et al. 2013. The Human Urine Metabolome. PLoS One. 8(9).
- Cerda Lorca J. y Villarroel Del P. L. 2008. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. Revista Chilena de Pediatría. 79(1):54.
- Chen L.F. y Sexton D.J. 2008. What's New in Rocky Mountain Spotted Fever ? Infectious Diseases Clinics of North America. 22:415-432.
- Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. Educational & Psychological Measurements. 20 (1): 37-46. doi:10.1177/001316446002000104
- Gobierno de México. Comisión Nacional del Agua. 2022. Resúmenes mensuales de temperatura y lluvia del Servicio Meteorológico Nacional. <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias>. Recurso en internet, consultado Junio 12, 2022
- Dantas-Torres F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Veterinary Parasitology. 152: 173-185.
- Delgado-de la Mora J., Sánchez-Montes S., Licona-Enríquez J.D., Delgado-de la Mora D., Paddock C.D., Beati L., et al. 2019. *Rickettsia parkeri* and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyoma maculatum* ticks, Mexico. Emerging Infectious Diseases; 25 (4): 836-38 DOI:10.3201/eid2504.181507
- Eremeeva M.E., Zambrano M.L., Anaya L., Beati L., Karpathy S.E., Santos-Silva M.M., et al. 2011. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* Ticks, Mexicali, Mexico. Journal of Medical Entomology. 48 (2): 418-421.
- Gopinath, K. y Singh, S. 2009. Urine as an adjunct specimen for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(3), 374-379. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.07.022>
- Gourinat, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C. y Dupont-Rouzeyrol, M. 2015. Detection of zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>

- Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 2017. Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de las Rickettsiosis. 11-64.
- Kamath, N. y Iyengar, A. 2017. Infections and the kidney : a tale from the tropics. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3785-2>
- Kato C.Y., Chung I.H., Robinson L.K., Austin A.L., Dasch G.A., Massunga R.F. 2013. Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(1):314-417.
- Kato C., Chung I., Paddock C.D. 2016. Estimation of *Rickettsia rickettsii* copy number in the blood of patients with Rocky Mountain spotted fever suggests cyclic diurnal trends in bacteraemia Appendix A. Supplementary data Acknowledgement References. *Clinical Microbiology and Infection*. 22(4):394-396.
- Labruna M.B., Whitworth T., Horta M.C., Bouyer D.H., McBride J.W., Pinter A., et al. 2004. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(1):90-98.
- Landis JR, Koch GG. 1977. No Title. *International Biometric Society*. 33:159-174.
- La Scola B. y Raoult D. 1997. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2715-2727.
- Oteo J.A., Nava S., Sousa R. de, Mattar S., Venzal J.M., Abarca K., et al. 2014. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Revista Chilena de Infectología*. 31(1):54-65.
- Parola P., Socolovschi C., Jeanjean L., Bitam I., Fournier P.E. y Sotto A. 2008. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsiosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2 (11): e338 doi:10.1371/journal.pntd.0000338
- Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Meddianikov O., Kernif T., et al. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (4): 657-702.
- Salinas Casado J. 2008. El estudio de la orina. Luis Cifuentes Delatte en el paso del arte a la ciencia. *Archivos Españoles de Urología*. 61(10):1197-1202.
- Santibáñez S., Portillo A., Santibáñez P., Palomar A.M. y Oteo J.A. 2013. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsiosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31 (5): 283-88.
- Stevens, J., Herberg, J. A. y Levin, M. 2014. *Infectious Diseases and the Kidney in Children*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27843-3>
- Walker D.H., Gay R.M. y Valdes-Dapena M. 1981. The occurrence of eschars in Rocky Mountain spotted fever. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 4:571-576.
- Zemtsova G.E., Montgomery M., y Levin M.L. 2015. Relative sensitivity of conventional and real-time PCR assays for detection of SFG *Rickettsia* in blood and tissue samples from laboratory animals. *PLoS One*. 10(1): e0116658



# Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de *Yucca*: una revisión

Extraction methods, functionality and bioactivity of saponins from *Yucca*: a review

Guadalupe Johanna Góngora-Chi<sup>1</sup>, Jaime Lizardi-Mendoza\*<sup>1</sup>, Yolanda Leticia López-Franco<sup>1</sup>, Marco Antonio López-Mata<sup>2</sup>, Luis Quihui-Cota<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Col. La Victoria 83304. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Campus Cajeme, Blvd. 39 Bordo Nuevo S/N, A.P. 85040, Antiguo Providencia, Cd. Obregón, Sonora, México

## RESUMEN

Las saponinas son metabolitos secundarios producidos naturalmente por las plantas debido al estrés biótico. Las plantas del género *Yucca* se consideran fuente de saponinas, particularmente de glucósidos esteroidales. Debido a su estructura química, son moléculas con diversas propiedades funcionales y con actividad biológica. Este documento explora de manera crítica los procesos tecnológicos reportados para la obtención de saponinas y extractos con saponinas de diversas especies del género *Yucca*, así como sus propiedades, bioactividad y aplicaciones actuales. Se considera que los extractos con saponinas de yuca presentan un potencial de uso a nivel industrial en diversas áreas, particularmente en tecnología de alimentos, salud y agropecuaria.

**Palabras clave:** *Yucca*, saponinas, bioactividad, métodos de extracción.

## ABSTRACT

Saponins are secondary metabolites produced naturally by plants in response to biotic stress. Plants of the *Yucca* genus are considered a source of saponins, particularly steroidal glycosides. Due to their chemical structure, they are molecules with diverse functional properties and biological activities. This review critically explores the reported technological procedures to obtain saponins and saponin rich extracts from species of the *Yucca* genus, as well as their properties, bioactivity, and current applications. *Yucca* saponin extracts are considered to have potential for industrial application in various areas, particularly in food technology, health and agriculture.

**Keywords:** *Yucca*, saponins, bioactivity, extraction methods.

## INTRODUCCIÓN

Las saponinas son un conjunto de metabolitos secundarios producidos principalmente por plantas, donde forman parte del sistema de defensa contra patógenos y depredadores. Diversos géneros de plantas pueden producir estos compuestos en distintas partes como semillas, raíces, hojas, frutos, tallos y cortezas. Un rasgo distintivo de las

saponinas es su capacidad de producir espuma por lo que tradicionalmente se han usado como jabón (Francis *et al.*, 2002; Reichert *et al.*, 2019).

Los usos actuales de las saponinas están directamente relacionados con su estructura química. Estas son moléculas anfífilas, con una parte hidrofóbica y otra hidrofílica (Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007; Vincken *et al.*, 2007). Esta característica hace que las saponinas tengan propiedades emulgentes y estabilizantes que han encontrado aplicación en el área farmacéutica y en la industria agroalimentaria (Cheok *et al.*, 2014). Muchas de las aplicaciones propuestas para las saponinas se basan en que su efecto y actividad generalmente son inocuas (Piacente, *et al.*, 2005; Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007) y biocompatibles. Incluso algunas saponinas o extractos ricos en saponinas han logrado certificaciones tipo GRAS (sustancia "Generalmente reconocida como segura", por su traducción del inglés) en diversas regiones del mundo (Environmental Protection Agency 2000, 2007; 21CFR172.510, 2019). Diversos estudios científicos han reportado saponinas con actividad inmunoestimulante, hipocolesterolemica, antiinflamatoria, antiparasitaria, antimicrobiana, antiviral e incluso propiedades anticancerígenas contra ciertas líneas celulares específicas (Lacaille-Dubois y Wagner, 1996; Francis *et al.*, 2002; Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007). Actualmente, investigaciones científicas continúan explorando características químicas y propiedades funcionales de saponinas de diversas fuentes vegetales, así como el desarrollo de tecnologías para la aplicación de extractos ricos en saponinas, particularmente en áreas médicas, nutricionales, tecnología de alimentos, agricultura, ganadería y acuicultura (Juang y Liang, 2020; Schreiner *et al.*, 2021).

Plantas pertenecientes a la subfamilia Agavoideae son consideradas fuentes de saponinas con propiedades funcionales atractivas para su uso (Simmons-Boyce y Tinto, 2007). En particular, especies del género *Yucca* han mostrado ser ricas en saponinas que se pueden encontrar en mayor proporción en tallos, hojas o rizomas dependiendo de la especie. Las yucas son un conjunto de especies de plantas nativas de América del Norte, que suelen encontrarse en hábitats áridos

\*Estos autores contribuyeron de manera igualitaria en este artículo

\*Autor para correspondencia: Jaime Lizardi Mendoza

Correo electrónico: jalim@ciad.mx

Recibido: 12 de julio de 2022

Aceptado: 31 de octubre de 2022

y semiáridos. Actualmente, poblaciones naturales de *Yucca schidigera* son aprovechadas a nivel comercial con uso principalmente en el área agropecuaria. El contenido de saponinas de este tipo de productos se considera esencial en sus aplicaciones. En este contexto resulta relevante desarrollar conocimiento tanto sobre las sustancias activas presentes en distintas yucas, como de los procedimientos tecnológicos aplicables para maximizar su extracción. Lo anterior es con la idea de que el aprovechamiento de la yuca, como un recurso natural valioso, sea efectivo y responsable. Por este motivo, se presenta una compilación crítica de las propiedades funcionales y los principales procesos de obtención de extractos ricos en saponinas de distintas especies del género *Yucca*.

### Saponinas

La palabra 'saponina' proviene del latín '*saponinus*', que significa "perteneciente al jabón" y hace referencia a la capacidad de esta sustancia para generar espuma similar al jabón (Juang y Liang, 2020). Es por esto que tradicionalmente las saponinas han sido empleadas como detergente, insecticida o fertilizante. Entre las aplicaciones actuales se encuentra su uso como limpiador de aguas residuales o como aditivo alimentario, por sus propiedades emulsionantes. De manera relevante, se utilizan extractos con saponinas para mejorar la producción agrícola, porque estimula el crecimiento de las plantas, además de tener actividad insecticida y antifúngica (Benichou *et al.*, 1999; Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007).

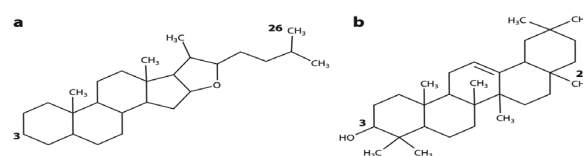
En la naturaleza, las saponinas son metabolitos secundarios distribuidos ampliamente en el reino vegetal. Su función fisiológica está implicada en la defensa contra patógenos y herbívoros (Cheek *et al.*, 2014; Juang y Liang, 2020). Diversas plantas son consideradas fuentes de saponinas y estas pueden localizarse en semillas, frutos, hojas, tallos y raíces. Usualmente las saponinas se encuentran formando parte de una matriz compleja con otros compuestos como azúcares, polifenoles, proteínas y lípidos (Cheeke, 2000). La cantidad de saponinas depende de una variedad de factores como la especie de planta, su edad, condiciones climáticas y presencia de patógenos o depredadores (Fenwick *et al.*, 1991).

### Estructura Química

En la estructura química de la saponina se reconocen dos partes principales. La parte conocida como aglicona o sapogenina es una estructura hidrofóbica que puede ser triterpenoide o esteroide (Figura 1). Las sapogeninas son denominadas acorde a la estructura del anillo principal; las de naturaleza triterpenoides, según su estructura principal, pueden ser oleanano pentacíclico, ursano, lupano y damarano tetracíclico (Figura 1a). Por otro lado, en las saponinas de naturaleza esteroide el núcleo de la estructura puede ser colestano tetracíclico, estirostano hexacíclico, furostano pentacíclico y cardenólido (Figura 1b) (Francis *et al.*, 2002; Cheeke *et al.*, 2006; Juang y Liang, 2020).

La parte complementaria de la estructura de saponinas son glúcidos de carácter hidrofílico. Las sapogeninas se

pueden clasificar según el número de residuos de azúcar y se denominan como mono, di- o tridesmosídicas cuando presentan uno, dos o tres residuos de azúcar, respectivamente. Las moléculas de azúcar en la estructura de las saponinas esteroidales usualmente están unidas en los carbonos C-3 y C-26. Por su parte, en las saponinas triterpenoides los glúcidos están unidos en los carbonos C-3 y C-28 (Francis *et al.*, 2002; Cheeke *et al.*, 2006; Juang y Liang, 2020). Entre los azúcares más comúnmente encontrados en saponinas se incluyen la D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico, ácido D-galacturónico, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-fucosa (Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007).



**Figure 1.** Basic chemical structure of the hydrophobic backbone of saponins that have either a (a) steroid (furostano) or (b) triterpene ( $\beta$ -amyrin type, oleananes) aglycone. Modified from Hostettmann & Marston (1995).

**Figura 1.** Estructura química del esqueleto de las sapogeninas con aglicona (a) esteroide (furostano) o (b) triterpeno (tipo  $\beta$ -amirina, oleananos).

Existen numerosas variaciones posibles en la estructura química, tanto de las sapogeninas (aglicona) como en los glúcidos incluidos. Es por esto que se han reportado una variedad considerable de saponinas de diversas fuentes vegetales y otros grupos de seres vivos. Incluso es común encontrar diversos tipos de saponinas presentes en una misma especie.

### Propiedades Funcionales

Debido a la variabilidad en su estructura química, las saponinas presentan características físico-químicas con diversas propiedades funcionales. Estas son base para su uso en diversas áreas, como la agricultura, biotecnología, industria alimentaria, cosmética y farmacología. Las saponinas son consideradas como surfactantes naturales útiles para la formación de emulsiones y espumas, con capacidad humectante y limpiadora. Por ello, recientemente se ha propuesto el uso de saponinas como reemplazo para los productos surfactantes de origen sintético, debido a que son obtenidas de fuentes renovables naturales (Bezerra *et al.*, 2021). También se está evaluando su incorporación en alimentos, considerando la actividad antimicrobiana y antiparasitaria de extractos con saponinas (Hasnudi *et al.*, 2019). Incluso organizaciones regulatorias internacionales, como la FDA, han otorgado el reconocimiento GRAS a saponinas de algunas especies para su uso como aditivo en alimentos y bebidas, estableciendo límites de consumo máximo para asegurar su inocuidad. Por su parte la FAO, a través del Codex Alimentarius, aprobó el uso del extracto de *Quillaja*, rico en saponinas triterpénicas, en bebidas y alimentos, con límite máximo de consumo de hasta 500 mg/kg al día (Reichert *et al.*, 2019; Jiménez *et al.*, 2021).

Las saponinas presentan actividad biológica, con beneficios a la salud, dependiendo principalmente del tipo de sapogenina, los azúcares unidos a la estructura y su concentración en la fuente vegetal. Entre las plantas utilizadas en la medicina herbal para tratar diversas enfermedades, la mayoría son consideradas fuentes de saponinas con potencial de aplicación médica mediante el desarrollo de fármacos (Tanaka *et al.*, 1996; Matsuura 2001; Kerwin, 2004). Por ejemplo, en la medicina tradicional china se utiliza el ginseng y otras plantas ricas en saponinas debido a su actividad antifúngica, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante y por efectos inmunomoduladores (Juang y Liang, 2020).

Entre las propiedades funcionales de las saponinas se ha reportado que pueden formar complejos insolubles con el colesterol, evitando su absorción y ayudando a su excreción, con efectos hipocolesterolémicos (inhibiendo el reciclaje del colesterol enterohepático) (Cheeke *et al.*, 2006). En estudios con animales, se han encontrado diferentes efectos de las saponinas a nivel sistémico, como incremento en la absorción de nutrientes a nivel gastrointestinal, mayor actividad hipoglucemiante e hipocolesterolémica, estimulación de las células mediadoras del sistema inmune, mayor producción de anticuerpos, así como función antioxidante, antifúngica, antiviral y antiparasitaria (Francis *et al.*, 2002). Debido a su naturaleza anfipática, presentan propiedades tensoactivas que mejoran la penetración de proteínas a través de las membranas celulares (Cheeke, 2000; Patel, 2012). Se ha investigado la actividad citotóxica de saponinas de diferentes plantas contra leucemia, cáncer de pulmón, colon, ovario, riñón, próstata y mama, encontrando que algunas de ellas tienen alta actividad contra las líneas de cáncer mencionadas (Patel, 2012).

### Fuentes

Las saponinas se pueden obtener de diversas partes de las plantas desde las semillas hasta la corteza (Francis *et al.*, 2002). Se ha reportado la presencia de saponinas en más de 100 familias de plantas y en algunas especies marinas como la estrella de mar y el pepino de mar. Una misma especie puede contener más de un solo tipo de saponinas, lo cual dependerá de diversos factores tanto ambientales como genéticos de la planta (Lacaille-Dubois y Wagner, 1996). Se considera también que los tratamientos durante la plantación, cosecha, postcosecha y procesamiento de la muestra afectan el tipo y cantidad de saponinas presentes (Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007).

En alimentos de consumo humano, las saponinas se encuentran en soya, lentejas, chícharos, frijoles, habas, maní, garbanzo, avena, quinoa, espárragos, té y ajo (Burrows *et al.*, 1987; Matsuura 2001; Kerem *et al.*, 2005). Dentro del reino vegetal se han identificado y caracterizado algunas saponinas de los géneros *Glycine*, *Chenopodium*, *Quillaja*, *Medicago*, *Aesculus*, *Malpighia*, *Glycyrrhiza*, *Saponaria*, *Trigonella* y *Yucca*, entre otras (Bezerra *et al.*, 2021).

Se ha identificado la presencia de saponinas en numerosas especies del género *Yucca*. Estas plantas son arbustos perenes de tallos duros y rígidos que viven durante muchos años (El Sayed *et al.*, 2020). Tomando en cuenta la cantidad de saponinas presentes en algunas especies de yuca, estas son consideradas fuente potencial para su extracción (Jiménez *et al.*, 2021).

### Saponinas de *Yucca*

El género *Yucca*, de la familia de las agaváceas, comprende alrededor de 50 especies de plantas diferentes. Estas, por lo general, viven en climas cálidos y secos, predominantemente en zonas desérticas, áridas y semiáridas de América del Norte y Central. Entre las especies que se encuentran en México, se han reportado *Yucca schidigera* (yuca de Mojave, [Mojave yucca]) en los desiertos de Baja California y Sonora, *Yucca baccata* (yuca banana, [dátil yucca]) en la sierra baja de Sonora, *Yucca elata* (yuca de árbol de jabón o cortadillo, [soaptree]) en los desiertos de Sonora y Chihuahua, o *Yucca elephantipes* (yuca de izote, yuca pie de elefante [giant yucca]) distribuida en el sureste de México. En las zonas áridas de Estados Unidos, prevalecen las especies *Yucca whipplei* (yuca chaparral o bayoneta española, [Chaparral yucca]) en el chaparral al sur de California y *Yucca brevifolia* (árbol de Josué, [Joshua tree]) en el desierto de Mojave (Patel, 2012; Gutiérrez-García *et al.*, 2021; Jiménez *et al.*, 2021). Nuestros ancestros empleaban algunas de estas especies con fines medicinales para tratar diversas condiciones como el dolor articular, sangrado, inflamaciones de la uretra y próstata. Se ha reportado que raíces de yuca se trituraban para hacer cataplasmas para tratar heridas y aliviar síntomas de enfermedades como el reumatismo (Waller y Yamasaki, 1996a; 1996b; Patel, 2012).

En el género *Yucca* predominan las saponinas de tipo espirostánico y furostánico en las especies *Y. gloriosa*, *Y. glauca*, *Y. schidigera*, *Y. aloifolia*, *Y. desmetiana*, *Y. elephantipes*, *Y. macrocarpa* y *Y. smalliana*. (Jiménez *et al.*, 2021). Específicamente, en *Y. schidigera* se han documentado saponinas de tipo esteroideal de espirostanos, en *Y. elephantipes* de tipo esteroideal, en *Y. gloriosa* de tipo esteroidales de furostanol, y en *Y. aloifolia* esteroidales de espirostanol (Bahuguna *et al.*, 1991; Nakano *et al.*, 1991a; Oleszek *et al.*, 2001; Kowalczyk *et al.*, 2011; Skhirtladze *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2018b).

Diversos estudios se han enfocado en la extracción de saponinas de las plantas del género *Yucca*. El contenido de saponinas en distintos extractos es variable, pues se emplean diversas técnicas de obtención y procesos de purificación, aunado a la variabilidad natural. Al momento se han reportado más de 100 diferentes saponinas de *Yucca* (Jiménez *et al.*, 2021). Solo algunos extractos ricos en saponinas y saponinas aisladas de las especies de *Yucca* mencionadas previamente son reconocidos como sustancias GRAS. Destaca el caso de *Yucca schidigera*, la cual cuenta con pruebas experimentales reconocidas que aseguran su inocuidad (Qu *et al.*, 2018b). A pesar de la identificación de algunas saponinas de las diver-

sas especies del género *Yucca*, aún son necesarios estudios para establecer rangos de concentración de consumo, que por un lado presenten bioactividad al tiempo que aseguran su inocuidad en el ser humano y otras especies (Piacente, *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2021).

### Métodos de obtención

Las propiedades funcionales de los extractos con saponinas de yuca, con aplicaciones principalmente en áreas de salud y agroalimentarias han motivado un creciente interés. Entre los objetivos predominantes en los estudios disponibles destaca la atención sobre los procesos de extracción (Cheok *et al.*, 2014). Actualmente existen diversas técnicas reportadas y utilizadas; no obstante, la selección de la técnica dependerá de factores como la condición y pureza de la muestra, el propósito del estudio y recursos económicos (Reichert *et al.*, 2019).

Entre las técnicas reportadas para la extracción de saponinas se encuentran, en primera instancia, los métodos que emplean solventes orgánicos, de uso habitual, pero que implican largos periodos y altas temperaturas para dispersar efectivamente la muestra y lograr la liberación de las saponinas y otros compuestos. Debido a los altos requerimientos de tiempo, energía y esfuerzo, además de rendimientos limitados obtenidos con estos procesos, han surgido los métodos basados en "tecnologías verdes". Este tipo de métodos hacen referencia a un mayor cuidado del medio ambiente y consisten en la optimización del tiempo, energía y el uso de solventes más seguros durante la extracción de las saponinas. Dentro de la tecnología habitual se encuentran las técnicas como maceración, reflujo, Soxhlet y procesos combinados o secuenciales. El uso de tratamientos con ultrasonido o microondas son ejemplos de tecnologías de extracción asistida. A pesar de los diversos beneficios atribuidos al uso de las tecnologías verdes, tanto en aspectos ambientales, de rendimiento y económicos, la mayoría de las investigaciones reportan extracciones usando los métodos tradicionales (Cheok *et al.*, 2014).

El conjunto de técnicas reportadas para la extracción de saponinas de las especies del género *Yucca* pueden clasificarse en métodos simples, complejos y con asistencia tecnológica. Los métodos simples consisten en la extracción directa del tejido vegetal con un solo tipo de disolvente. Los métodos complejos utilizan una secuencia determinada de extracciones simples con uno o más solventes distintos. Por su parte, los métodos con asistencia tecnológica utilizan equipos especializados basados en procesos físicos, como la cavitación (ultrasonido) o vibración inducida de dipolos (microondas), para mejorar la eficiencia de procesos de extracción basados en solventes (Cheok *et al.*, 2014; Reichert *et al.*, 2019). La mayoría de las extracciones reportadas para las especies de *Yucca* son de tipo complejo, empleando diversos solventes. Solo algunos reportes incluyen también procedimientos de purificación para aislar y caracterizar las saponinas presentes en los extractos vegetales (Jiménez *et al.*, 2021).

Un esquema general para la obtención del extracto con saponinas inicia con en el acondicionamiento de la materia prima. Esta etapa incluye desde la obtención de la materia prima (tejido vegetal), almacenamiento, secado, molienda y otros, hasta tener el material listo para la etapa de extracción. En dicha etapa se utiliza el procedimiento seleccionado de cualquiera de los tipos mencionados anteriormente. Finalmente, los pasos subsecuentes estarán determinados por el grado de pureza que se desea lograr, ya sea utilizar los extractos en crudo o utilizar métodos de purificación y aislamiento (como cromatografía) para obtener las distintas saponinas presentes en la muestra (Cheok *et al.*, 2014; Reichert *et al.*, 2019; Jiménez *et al.*, 2021).

Para obtención de los extractos de *Yucca gloriosa* se han utilizado rizomas, hojas y flores de la planta; entre los solventes reportados se menciona el metanol, butanol, hexano, cloroformo y agua (Montoro *et al.*, 2010; Skhirtladze *et al.*, 2011). Para la identificación de las saponinas (glucósidos esteroidales), las hojas fueron sometidas a una extracción inicial con metanol - agua, posteriormente se realizó la evaporación de metanol y se sometió a una segunda extracción con cloroformo para eliminar compuestos lipofílicos que pudiera contener el extracto. El tratamiento butanólico fue utilizado como una purificación previa a la cromatografía HPLC-MS para la identificación y caracterización de saponinas (Kemertelidze *et al.*, 2011).

Utilizando *Yucca schidigera* como materia prima, se han obtenido extractos de la corteza y el tallo. Entre los solventes utilizados se encuentran cloroformo, agua, etanol y metanol, empleando procedimientos tipo Soxhlet y columnas empacadas (Miyakoshi *et al.*, 2000; Kowalczyk *et al.*, 2011). Otros estudios reportan extracción mediante reflujo con etanol-agua y posterior purificación con cromatografía (Qu *et al.*, 2018a; 2018b).

Investigaciones basadas en el aislamiento y purificación de saponinas de distintas especies de yuca suelen utilizar procesos de extracción con mezclas agua-alcohol. También se han empleado procesos de extracción metanólica simple para hojas o rizomas de especies como *Y. glauca*, *Y. desmettiana* y *Y. elephantipes* (Diab *et al.*, 2012; Yokosuka *et al.*, 2014). Saponinas esteroidales de tipo epirostanol fueron aisladas de *Y. aloifolia* usando etanol como disolvente (Kishor y Sati, 1990; Bahuguna *et al.*, 1991). También se han reportado tratamientos más severos, como maceración y extracción con acetato de etilo más el proceso Soxhlet con eter de petróleo para la extracción de saponinas de hojas de *Y. filamentosa* (Plock *et al.*, 2001). A nivel industrial, existen productos de extractos de *Yucca schidigera* con aplicaciones en granjas, acuicultura, agricultura, rolado de granos, tratamiento de agua y uso humano sin especificación sobre los métodos de obtención del extracto (AGROIN, 2022).

### Caracterización

Para la cuantificación e identificación de las saponinas suelen utilizarse métodos espectrofotométricos y cromatográficos. En general, las técnicas de espectrofotometría son



consideradas simples, rápidas y económicas. Este tipo de técnicas es particularmente útil para la determinación de la concentración total de saponinas en una muestra. Se ha reportado el uso de anisaldehído, ácido sulfúrico y/o acetato de etilo para formar cromóforos, pero el método más utilizado conocido como 'vainillina-ácido sulfúrico' se basa en la oxidación de las saponinas triterpénicas con vainillina. Se debe tener en consideración factores como los estándares a utilizar, la longitud de onda con la que se trabajará y condiciones de tratamiento de la muestra para la selección de la metodología. Estudios para la cuantificación de saponinas de diversas plantas han reportado rangos de longitud de onda 480 – 610 nm (Liu *et al.*, 2012; Mostafa *et al.*, 2013).

La cromatografía es una técnica especializada utilizada para cuantificar un tipo de saponinas en específico. Los métodos más comúnmente empleados para la identificación y separación de saponinas emplean cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de capa fina (TLC). Ambos métodos se han utilizado para identificar saponinas presentes en el género *Yucca*. Para *Y. schidigera* se ha utilizado HPLC, logrando la identificación y separación de 25 saponinas de espirostanol. Para *Y. gloriosa* se obtuvo un rendimiento por encima del 25 % p/p de saponinas glucósidos esteroidales (Skhirtladze *et al.*, 2011; Mostafa *et al.*, 2016; Qu *et al.*, 2018a). Se ha documentado también el uso de cromatografía HPLC-ELSD para la identificación y cuantificación de saponinas esteroidales de *Y. schidigera* (Sastre *et al.*, 2016).

### Funcionalidad

La funcionalidad de los extractos obtenidos de las diferentes partes de la yuca dependerá, en gran medida, de estructura química de las saponinas presentes. La variabilidad estructural, tanto de las saponinas como de los azúcares unidos a ella, proporcionan diversas funcionalidades a los extractos con saponina (Bezerra *et al.*, 2021).

### Actividad emulsificante

Patentes e investigaciones científicas han reportado la capacidad de extractos de *Yucca* (sin especificación de especie) para formar emulsiones (Beath 1914; Ralla *et al.*, 2018). Las propiedades emulsificantes tienen uso en la industria de alimentos y cosmética. Recientemente, se ha aumentado la demanda por la búsqueda de productos de origen natural para la utilización en la industria alimentaria. Debido a su carácter anfifílico, las saponinas presentan la capacidad para formar emulsiones. Entre las pruebas realizadas a las emulsiones formadas están la estabilidad, pH, fuerza iónica, calentamiento, almacenamiento y congelación-descongelación (Ralla *et al.*, 2018; Schreiner *et al.*, 2021). La actividad emulsificante del extracto de *Yucca* se midió durante la formación de partículas; la adición de extracto disminuyó el tamaño hasta 5 veces, logrando la formación de partículas en escala micro, comparable con el uso de emulsificantes sintéticos (Tween 80) y naturales (goma arábiga) (Ralla *et al.*, 2018).

### Propiedades espumantes

Las propiedades espumantes se relacionan con el poder limpiador de una emulsión con usos en diversas áreas y define su capacidad de limpieza (Mainkar y Jolly, 2000). Este método consiste en determinar el poder y la estabilidad espumante mezclando dos soluciones para formar espuma. Se mide la altura de la espuma generada al momento de la mezcla y 5 min después. La primera medición se refiere al poder espumante mientras que la segunda medición (5 min después) a la estabilidad (Chen *et al.*, 2010). El poder espumante ha sido estudiado en saponinas puras, presentando un poder y estabilidad emulsificante 390 % mayor en comparación con extractos crudos de plantas (*Tribulus terrestris*, *Trigonella foenum-graecum* y *Ruscus aculeatus*), siendo consideradas como buenos agentes emulsificantes y determinando su utilidad en diversas áreas de la industria donde esta propiedad es requerida (Schreiner *et al.*, 2021).

### Tensión interfacial y superficial

La actividad en la interfase en las emulsiones hace referencia a la estabilidad de la emulsión y es importante para el diseño de las mismas. Diversos estudios han reportado valores de tensión interfacial en compuestos naturales y sintéticos, reportando mayor actividad en compuestos naturales (polisacáridos, proteínas y extractos ricos en saponinas) en comparación con los sintéticos (Ralla *et al.*, 2017). Ralla y colaboradores (2018) reportaron una disminución de la tensión en la superficie al adicionar concentraciones del extracto de yuca en un rango de 85 a 52 % con valores más bajos observados en tensión interfacial de  $3.4 \pm 0.1 \text{ mN m}^{-1}$  y de  $37.9 \pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$  para la tensión superficial que indican la adsorción de moléculas de saponina anfifílicas a las interfases. Estos valores demostraron ser similares a valores obtenidos para emulsificantes sintéticos utilizados en la industrial (Ralla *et al.*, 2018).

La tensión superficial tiene también relación con la capacidad detergente, ya que al reducir la tensión se considera un buen detergente. Mientras más tensioactiva sea considerada una sustancia, presenta mayor reducción de la tensión interfacial. Su relación con la concentración es inversamente proporcional, es decir, a menor actividad superficial mayor será la cantidad de emulsionante requerido para lograr el efecto deseado (Mainkar y Jolly, 2000).

### Actividad biológica

Al igual que las saponinas extraídas de otras plantas, las saponinas de *Yucca* han demostrado presentar diversos efectos bioactivos. Entre estos se destaca actividad antiinflamatoria, antifúngica, antimicrobiana y antiparasitaria (Tabla 1). La actividad citotóxica se ha reportado sólo en algunas especies como *Y. glauca*, *Y. desmetiana*, *Y. gloriosa*, *Y. filamentosa* y *Y. schidigera*. Se considera que la actividad mostrada por cada muestra está determinada por la fuente, así como por la estructura química particular de la saponina (Eskander *et al.*, 2013; Yokosuka *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2018a).

Se ha encontrado actividad antifúngica en extractos con saponinas de *Yucca schidigera*, tanto en pruebas *in vitro* como en estudios de tecnología de alimentos. Esta propiedad se les atribuye a las saponinas de tipo espirostanos presentes en los extractos (Piacente et al., 2005). Se percibe un potencial considerable de aplicación de los extractos con saponinas de yuca en la industria alimentaria, debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. De igual manera se ha observado que extractos con saponinas de yuca mejoran el contenido de lípidos en carne de pollo para consumo humano. Se logra una disminución de las grasas saturadas e incrementos en ácidos grasos esenciales y poliinsaturados (Piacente et al., 2005; Benamirouche et al., 2020).

Recientemente se ha reportado actividad antiparasitaria y antimicrobiana efectiva de extractos con saponina de *Y. baccata* (Quihui-Cota et al., 2014; Gutiérrez-García et al., 2021). Por su parte, estudios sobre la bioactividad de las saponinas encontradas en *Y. gloriosa* han reportado que estas evitan la agregación plaquetaria, con un efecto positivo en el

sistema circulatorio al evitar eventos de trombosis (Skhirtladze et al., 2011).

### Aplicaciones

Debido a sus propiedades emulsificantes, espumantes, humectantes y de reducción de la tensión superficial, algunas saponinas y extractos de saponinas tienen aplicaciones en la industria cosmética, farmacéutica, agrícola y alimentaria (Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007). Estas son reconocidas por organismos regulatorios internacionales como aditivo seguro para el consumo humano, además de ser consideradas no tóxicas, ni mutagénicas. Es por esto que los extractos de *Yucca* ricos en saponinas tienen un potencial considerable de uso a nivel industrial en formulaciones de bebidas y alimentos. En la industria alimentaria, *Yucca schidigera* es una de las especies que cuenta con la clasificación como aditivo alimentario en Estados Unidos por la FDA (21CFR172.510, 2019); el extracto de rizomas se utiliza como potenciador de sabor en alimentos y agente espumante en bebidas carbonatadas (Tanaka et al., 1996).

**Tabla 1.** Bioactividad e identificación de saponinas y extractos ricos en saponinas obtenidas de distintas especies del género *Yucca*.

**Table 1.** Bioactivity and identification of saponins and saponin-rich extracts obtained from different *Yucca* species.

Especie	Parte de la Planta	Tipo de Saponina	Bioactividad	Referencia
<i>Y. filamentosa</i>	Hojas	Esteroidal	antimicrobiana	(El Sayed et al., 2020)
	Raíz	Esteroidal		(Plock et al., 2001)
<i>Y. gloriosa</i>	Tallo	Esteroidal		(Nakano et al., 1991a)
	Flores	Esteroidal		(Nakano et al., 1991b)
	Rizomas	Esteroidal (espirostanos, furostanos y colestano)		(Skhirtladze et al., 2006)
<i>Y. schidigera</i>	Tallo (Agro industrias)	Espirostanol	Antimicrobiana: bactericida y fungicida en alimentos	(Miyakoshi et al., 2000)
	Polvo de Yucca (Dessertking)	Esteroidal	Antimicrobiana en animales	(Oleszek et al., 2001; Narvaez et al., 2013)
	Rizomas	Esteroidal (furostanol)	Antiagregación plaquetaria	(Skhirtladze et al., 2011)
		Espirostanol (yuccaol y yuccaone)	Antioxidante	(Wang et al., 2000)
	Extracto (Desertking) y polvo de corteza	Esteroidal		(Kowalczyk et al., 2011)
	Tallo	Espirostanol		(Quet et al., 2018a; 2018b)
	-	-	Antiinflamatoria	(Cheeke et al., 2006)
Extracto		Reducción de ácidos grasos	Benamirouche et al., 2020	
<i>Y. glauca</i>	Rizomas	Esteroidal	Actividad citotóxica	(Yokosuka et al., 2014)
<i>Y. smalliana</i>	Hojas	Esteroidal	Antimicrobiana y antifúngica	(Jin et al., 2007)
<i>Y. baccata</i>	Tallo (extracto)	Esteroidales	Antiparasitaria y antimicrobiana	(Quihui-Cota et al., 2014; Gutiérrez-García et al., 2021)
<i>Y. aloifolia</i>	Hojas	Yuccaol B y C	Citotóxica	(Simmons-Boyce y Tinto, 2007)

En Japón, las sustancias compuestas de saponinas obtenidas de *Y. schidigera* se encuentran dentro de la lista de aditivos alimentarios existentes, aprobado para ser usado como aditivo natural por el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón (The Japan Food Chemical Research Foundation 2022). Entre sus usos como aditivo alimentario se han reportado como emulsificante en bebidas y remoción de colesterol en productos lácteos durante el procesamiento de los alimentos (Piacente *et al.*, 2005).

Existen al menos dos empresas dedicadas a la investigación y comercialización de saponinas de *Y. schidigera*: Desert King (Desert King Int., 2021) y Baja Agro International S. A. de C. V. (AGROIN, 2022). Actualmente, en el mercado se encuentran disponibles el polvo y el extracto acuoso de *Y. schidigera*, productos derivados de la planta usadas como fuentes de saponinas para diferentes usos. Se ha documentado su uso en productos de limpieza, de uso personal en cosmética, en la industria farmacéutica, alimentación para animales y aditivo en bebidas carbonatadas debido a sus propiedades surfactantes (Piacente *et al.*, 2005; Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007).

## CONCLUSIONES

Las plantas del género *Yucca* son una fuente de saponinas que han demostrado propiedades biológicas y funcionales con potencial aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica. Debido a la complejidad de la estructura de las saponinas, sus características físico-químicas (como su solubilidad en agua) y la matriz en la que se encuentran en la planta, la optimización de los métodos de extracción es un factor que puede contribuir al avance del conocimiento sobre las pruebas funcionales y bioactividad de la saponinas de las especies de este género.

Debido a las propiedades biológicas y sus beneficios a la salud, algunas saponinas estudiadas en las plantas de *Yucca* pueden servir como base para el desarrollo de nutraceuticos, en el diseño de alimentos y bebidas, y como reemplazo de las sustancias sintéticas utilizadas para lograr efectos antimicrobianos, conservadores y emulsificantes en los alimentos, estableciendo límites máximos de uso para asegurar su inocuidad y bioactividad.

Los métodos utilizados actualmente se basan en el uso de métodos tradicionales con grandes volúmenes de solventes. La optimización de los métodos de extracción pretende la utilización de tecnologías acopladas a los métodos ya existentes para aumentar los rendimientos y optimizar el tiempo, permitiendo el estudio de los extractos ricos en saponinas, así como el aislamiento, identificación y cuantificación de las saponinas presentes en el extracto.

## REFERENCIAS

21CFR172.510. (2019). CFR - Code of Federal Regulations Title 21. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Code of Federal Regulations. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/cfrsearch.cfm?fr=172.510>

- Bahuguna, S., Kishor, N., Sati, O.P., Sati, S.P., Sakakibara, J. y Kaiya, T. 1991. A New Spirostanol Glycoside from *Yucca aloifolia*. *Journal of Natural Products*. 54 (3): 863-865.
- Baja Agro International S.A. de C.V. (AGROIN). [Consultado 28 Abril 2022] 2022. Disponible en: <https://yucca.com.mx>
- Beath, O.A. 1914. The Composition and Properties of the Yucca Plant. *Transactions of the Kansas Academy of Science* (1903-), 27, 102-104.
- Benamirouche, K., Baazize-Amami, D., Hezil, N., Djeddar, R., Niar, A. y Guetarni, D. 2020. Effect of probiotics and *Yucca schidigera* extract supplementation on broiler meat quality. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 42: 48006.
- Benichou, A., Aserin, A. y Garti, N. 1999. Steroid-Saponins from Fenugreek Seeds: Extraction, Purification and Surface Properties. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 20 (1-2): 581-605.
- Bezerra, K.G.O., Silva, I.G.S., Almeida, F.C.G., Rufino, R.D. y Sarubbo, L.A. 2021. Plant-derived biosurfactants: Extraction, characteristics and properties for application in cosmetics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 34: 102036.
- Burrows, J.C., Price, K.R. y Fenwick, G.R. 1987. Soyasaponin IV an additional monodesmosidic saponin isolated from soyabean. *Phytochemistry*. 26 (4): 1214-1215.
- Cheeke, P., Piacente, S. y Oleszek, W. 2006. Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Effects of *Yucca schidigera*: A Review. *Journal of Inflammation*. 3 (1): 6.
- Cheeke, P.R. 2000. Actual and Potential Applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* Saponins in Human and Animal Nutrition. En: *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*. W. Oleszek y A. Marston (ed), pp. 241-254. Springer. Dordrecht, Netherlands.
- Chen, Y. F., Yang, C. H., Chang, M. S., Ciou, Y.P. y Huang, Y. C. 2010. Foam Properties and Detergent Abilities of the Saponins from *Camellia oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences*. 11 (11): 4417-4425.
- Cheok, C.Y., Salman, H.A.K. y Sulaiman, R. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*. 59: 16.
- Desert King: The Natural Choice for Quillaja, Yucca and Jojoba Extracts. [Consultado 21 Octubre 2021] 2021. Disponible en: <https://desertking.com>.
- Diab, Y., Ioannou, E., Emam, A., Vagias, C. y Roussis, V. 2012. Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from *Yucca desmettiana*. *Steroids*. 77 (6): 686-690.
- El Sayed, A.M., Basam, S.M., El Naggar, E. M. bellah A., Marzouk, H.S. y El Hawary, S. 2020. LC-MS/MS and GC-MS profiling as well as the antimicrobial effect of leaves of selected *Yucca* species introduced to Egypt. *Scientific Reports*. 10 (1): 17778.
- Environmental Protection Agency. (2000). *Yucca Extract; Exemption From the Requirement of a Tolerance*. Federal Register; EPA-HQ-OPP-2007-0289. <https://www.federalregister.gov/documents/2000/09/29/00-24946/yucca-extract-exemption-from-the-requirement-of-a-tolerance>
- Environmental Protection Agency. (2007). *Quillaja Saponaria Extract; Exemption from the Requirement of a Tolerance*. Federal Register; 72 FR 41931. <https://www.federalregister.gov/documents/2007/08/01/E7-14894/quillaja-saponaria-extract-exemption-from-the-requirement-of-a-tolerance>

- Eskander, J., Sakka, O.K., Harakat, D. y Lavaud, C. 2013. Steroidal saponins from the leaves of *Yucca desmetiana* and their in vitro antitumor activity: structure activity relationships through a molecular modeling approach. *Medicinal Chemistry Research*. 22 (10): 4877-4885.
- Fenwick, G.R., Price, K.R., Tsukamoto, C. y Okubo, K. 1991. Chapter 12 - Saponins. En: *Toxic Substances in Crop Plants*. J.P.F. D'Mello, C.M. Duffus y J.H. Duffus (ed), pp. 285-327. Woodhead Publishing, Edinburgh, Scotland.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S. y Becker, K. 2002. The Biological Action of Saponins in Animal Systems: A Review. *British Journal of Nutrition*. 88 (6): 587-605.
- Güçlü-Üstündağ, Ö. y Mazza, G. 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47 (3): 231-258.
- Gutiérrez-García, G.J., Quintana-Romero, L.A., Morales-Figueroa, G.G., Esparza-Romero, J., Pérez-Morales, R., López-Mata, M.A., Juárez, J., Sánchez-Escalante, J.J., Peralta, E., Quihui-Cota, L. y Soto-Valdez, H. 2021. Effect of *Yucca baccata* butanolic extract on the shelf life of chicken and development of an antimicrobial packaging for beef. *Food Control*. 127: 108142.
- Hasnudi, Mirwandhono, R.E. y Siregar, G.A.W. 2019. Addition of andaliman to shelf life of beef nugget. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 260 (1): 012060.
- Jiménez, G.G., Durán, A.G., Macías, F.A. y Simonet, A.M. 2021. Structure, Bioactivity and Analytical Methods for the Determination of Yucca Saponins. *Molecules*. 26 (17): 5251.
- Jin, Y. L., Kuk, J. H., Oh, K. T., Kim, Y. J., Piao, X. L. y Park, R. D. 2007. A new steroidal saponin, yuccalan, from the leaves of *Yucca smalliana*. *Archives of Pharmacal Research*. 30 (5): 543-546.
- Juang, Y. P. y Liang, P. H. 2020. Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules*. 25 (21): 4974.
- Kemertelidze, E., Benidze, M. y Skhirtladze, A. 2011. Steroidal Glycosides from the Leaves of *Yucca gloriosa* L. *Bulletin of the Georgian National Academy of Science* S. 5 (1): 6.
- Kerem, Z., German-Shashoua, H. y Yarden, O. 2005. Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85 (3): 406-412.
- Kerwin, S. 2004. Soy Saponins and the Anticancer Effects of Soybeans and Soy-Based Foods. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 4 (3): 263-272.
- Kishor, N. y Sati, O.P. 1990. A New Molluscicidal Spirostanol Glycoside of *Yucca aloifolia*. *Journal of Natural Products*. 53 (6): 1557-1559.
- Kowalczyk, M., Pecio, Ł., Stochmal, A. y Oleszek, W. 2011a. Qualitative and Quantitative Analysis of Steroidal Saponins in Crude Extract and Bark Powder of *Yucca schidigera* Roetz. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (15): 8058-8064.
- Lacaille-Dubois, M.A. y Wagner, H. 1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*. 2 (4): 363-386.
- Liu, Y. W., Zhu, X., Lu, Q., Wang, J. Y., Li, W., Wei, Y. Q. y Yin, X.-X. 2012. Total saponins from *Rhizoma Anemarrhenae* ameliorate diabetes-associated cognitive decline in rats: Involvement of amyloid-beta decrease in brain. *Journal of Ethnopharmacology*. 139 (1): 194-200.
- Mainkar, A.R. y Jolly, C.I. 2000. Evaluation of commercial herbal shampoos. *International Journal of Cosmetic Science*. 22 (5): 385-391.
- Matsuura, H. 2001. Saponins in Garlic as Modifiers of the Risk of Cardiovascular Disease. *The Journal of Nutrition*. 131 (3): 1000-1005.
- Miyakoshi, M., Tamura, Y., Masuda, H., Mizutani, K., Tanaka, O., Ikeda, T., Ohtani, K., Kasai, R. y Yamasaki, K. 2000. Antiyeast Steroidal Saponins from *Yucca schidigera* (Mohave Yucca), a New Anti-Food-Deteriorating Agent. *Journal of Natural Products*. 63 (3): 332-338.
- Montoro, P., Skhirtladze, A., Perrone, A., Benidze, M., Kemertelidze, E. y Piacente, S. 2010. Determination of steroidal glycosides in *Yucca gloriosa* flowers by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 52 (5): 791-795.
- Mostafa, A., Sudisha, J., El Sayed, M., Ito, S., Ikeda, T., Yamauchi, N. y Shigyo, M. 2013. Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. *Phytochemistry Letters*. 6 (2): 274-280.
- Mostafa, A.E., El Hela, A.A., Mohammad, A.I., Cutler, S.J. y Ross, S.A. 2016. New triterpenoidal saponins from *Koeleruteria paniculata*. *Phytochemistry Letters*. 17: 213-218.
- Nakano, K., Hara, Y., Murakami, K., Takaishi, Y. y Tomimatsu, T. 1991a. 12-Hydroxy steroidal glycosides from the caudex of *Yucca gloriosa*. *Phytochemistry*. 30 (6): 1993-1995.
- Nakano, K., Midzuta, Y., Hara, Y., Murakami, K., Takaishi, Y. y Tomimatsu, T. 1991b. 12-Keto steroidal glycosides from the caudex of *Yucca gloriosa*. *Phytochemistry*. 30 (2): 633-636.
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C. y Cheeke, P. 2001. Steroidal Saponins of *Yucca schidigera* Roetz. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (9): 4392-4396.
- Patel, S. 2012. *Yucca*: A Medicinally Significant Genus with Manifold Therapeutic Attributes. *Natural Products and Bioprospecting*. 2 (6): 231-234.
- Piacente, S., Pizza, C. y Oleszek, W. 2005. Saponins and Phenolics of *Yucca schidigera* Roetz: Chemistry and Bioactivity. *Phytochemistry Reviews*. 4 (2): 177-190.
- Plock, A., Beyer, G., Hiller, K., Gründemann, E., Krause, E., Nimtz, M. y Wray, V. 2001. Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. *Phytochemistry*. 57 (3): 489-496.
- Qu, L., Ruan, J., Wu, S., Huang, P., Yan, J., Yu, H., Zhang, Y. y Wang, T. 2018a. Separation and Bioactive Assay of 25R/S-Spirostanol Saponin Diastereomers from *Yucca schidigera* Roetz (Mojave) Stems. *Molecules*. 23 (10): 2562.
- Qu, L., Wang, J., Ruan, J., Yao, X., Huang, P., Wang, Y., Yu, H., Han, L., Zhang, Y. y Wang, T. 2018b. Spirostan-Type Saponins Obtained from *Yucca schidigera*. *Molecules*. 23 (1): 167.
- Quihui-Cota, L., León-Trujillo, R., Astiazarán-García, H., Esparza-Romero, J., Robles, M. del R., Robles-Zepeda, R.E., Canett, R. y Sánchez-Escalante, J. 2014. Marked Antigiardial Activity of *Yucca baccata* Extracts: A Potential Natural Alternative for Treating Protozoan Infections. *BioMed Research International*. 2014: 1-6.
- Ralla, T., Herz, E., Salminen, H., Edelmann, M., Dawid, C., Hofmann, T. y Weiss, J. 2017. Emulsifying Properties of Natural Extracts from *Panax ginseng* L. *Food Biophysics*. 12 (4): 479-490.
- Ralla, T., Salminen, H., Tuosto, J. y Weiss, J. 2018. Formation and stability of emulsions stabilised by *Yucca* saponin extract. *International Journal of Food Science & Technology*. 53 (6): 1381-1388.



- Reichert, C.L., Salminen, H. y Weiss, J. 2019. Quillaja Saponin Characteristics and Functional Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*. 10 (1): 43-73.
- Sastre, F., Ferreira, F. y Pedreschi, F. 2016. MALDI-TOF mass spectrometry and reversed-phase HPLC-ELSD chromatography for structural and quantitative studies of major steroid saponins in commercial extracts of *Yucca schidigera* Roetzl. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 120: 270-282.
- Schreiner, T.B., Colucci, G., Santamaria-Echart, A., Fernandes, I.P., Dias, M.M., Pinho, S.P. y Barreiro, M.F. 2021. Evaluation of saponin-rich extracts as natural alternative emulsifiers: A comparative study with pure Quillaja Bark saponin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 623: 126748.
- Simmons-Boyce, J.L. y Tinto, W.F. 2007. Steroidal Saponins and Sapogenins from the Agavaceae Family. *Natural Product Communications*. 2 (1): 99.
- Skhirtladze, A., Perrone, A., Montoro, P., Benidze, M., Kemertelidze, E., Pizza, C. y Piacente, S. 2011. Steroidal saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes: LC-MS profiling, isolation and quantitative determination. *Phytochemistry*. 72 (1): 126-135.
- Skhirtladze, A., Plaza, A., Montoro, P., Benidze, M., Kemertelidze, E., Pizza, C. y Piacente, S. 2006. Furostanol saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes. *Biochemical Systematics and Ecology*. 34 (11): 809-814.
- Tanaka, O., Tamura, Y., Masuda, H. y Mizutani, K. 1996. Application of Saponins in Foods and Cosmetics: Saponins of Mohave Yucca and *Sapindus Mukurossi*. En: *Saponins Used in Food and Agriculture*. G.R. Waller y K. Yamasaki (ed), pp. 1-11. Springer US. Boston, MA.
- The Japan Food Chemical Research Foundation. List of Existing Food Additives [Consultado 28 Abril 2022] 2022. Disponible en: <https://www.ffcr.or.jp/en/tenka/list-of-existing-food-additives/list-of-existing-food-additives.html>
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A. y Gruppen, H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68 (3): 275-297.
- Waller, G.R. y Yamasaki, K. 1996a. *Saponins Used in Food and Agriculture*. 1 ed. Springer. Boston, MA.
- Waller, G.R. y Yamasaki, K. 1996b. *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine*. 1 ed. Springer. Boston, MA.
- Wang, Y., McAllister, T. A., Yanke, L. J. y Cheeke, P. R. 2000. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (5): 887-896.
- Yang, C. H., Huang, Y. C., Chen, Y. F. y Chang, M. H. 2020. Foam properties, detergent abilities and long-term preservative efficacy of the saponins from *Sapindus mukorossi*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 18 (3): 155-160.
- Yokosuka, A., Suzuki, T., Tatsuno, S. y Mimaki, Y. 2014. Steroidal glycosides from the underground parts of *Yucca glauca* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*. 101: 109-115.
- Zhang, Y., Yang, C. R. y Zhang, Y. J. 2013. New Steroidal Saponins from the Leaves of *Yucca elephantipes*. *Helvetica Chimica Acta*. 96 (9): 1807-1813.

## Dietary sources, bioavailability and health effects of carotenoids

Fuentes dietarias, biodisponibilidad y efectos en salud de carotenoides

**Claudia I. Victoria-Campos<sup>1</sup>, Juan Ornelas-Paz<sup>2</sup>, Saul Ruiz-Cruz<sup>3</sup>, José de Jesús Ornelas-Paz<sup>2\*</sup>, Braulio Cervantes-Paz<sup>4</sup>, Claudio Rios-Velasco<sup>2</sup>, Jaime David Pérez-Martínez<sup>5</sup>, Alfonso A. Gardea-Béjar<sup>6</sup>, Elhadi M. Yahia<sup>7</sup>, Vrani Ibarra-Junquera<sup>8</sup>**

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Enfermería y Nutrición, Av. Niño Artillero No. 130, Zona Universitaria, C.P. 78240, San Luis Potosí, Mexico.

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.-Unidad Cuauhtémoc, Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, Mexico.

<sup>3</sup> Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales S/N, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

<sup>4</sup> Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Altair 200, Col. Del Llano. C.P. 78377, San Luis Potosí, México.

<sup>5</sup> Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Manuel Nava 6 Zona Universitaria. C.P. 78210, San Luis Potosí, México.

<sup>6</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.-Unidad Guaymas, Carretera al Varadero Nacional Km. 6.6, Col. Las Playitas. C.P. 85480, Guaymas, Sonora, México.

<sup>7</sup> Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales, Avenida de las Ciencias S/N. C.P. 76230, Juriquilla, Querétaro, Mexico.

<sup>8</sup> Universidad de Colima, Laboratorio de Bioingeniería, Km. 9 carretera Coquimatlán-Colima. C.P. 28400, Coquimatlán, Colima, Mexico.

### ABSTRACT

Carotenoids are non-polar compounds found in fruits and vegetables. The consumption of these compounds has been associated with many beneficial effects on human health, especially on the prevention of chronic diseases that are currently considered as problems of public health. These effects have mainly been attributed to the antioxidant properties of carotenoids, although many other mechanisms are involved, including the influence of carotenoids in the expression of genes involved in the pathogenesis of these diseases. Unfortunately, the bioavailability of these compounds is very limited. The effects of several factors on carotenoid bioavailability have been studied in order to identify the best strategies to increase their absorption and, consequently, their bioactivity. This review analyzes in a systematic fashion the recent findings on the composition of carotenoids composition in plant foods, and their bioavailability and beneficial effects on human health.

**Keywords:** Absorption, bioactivity, non-polar pigments, nutraceuticals, plant foods.

### RESUMEN

Los carotenoides son compuestos no polares que se encuentran en frutas y hortalizas. El consumo de estos compuestos se ha asociado con muchos efectos benéficos para la salud humana, especialmente en la prevención de enfermedades crónicas que actualmente se consideran problemas de salud pública. Estos efectos se han atribuido principalmente

a las propiedades antioxidantes de los carotenoides, aunque muchos otros mecanismos están involucrados en estos efectos, incluida la influencia de los carotenoides en la expresión de genes implicados en la patogénesis de estas enfermedades. Desafortunadamente, la biodisponibilidad de estos compuestos es muy limitada, razón por la cual se han estudiado los efectos de varios factores en la biodisponibilidad de los carotenoides con el fin de identificar las mejores estrategias para aumentar la absorción de estos compuestos y, en consecuencia, su bioactividad. En esta revisión se analizan de manera sistemática los descubrimientos recientes sobre la composición de carotenoides en alimentos de origen vegetal y su biodisponibilidad y efectos protectores de la salud humana.

**Palabras clave:** Absorción, alimentos vegetales, bioactividad, nutraceuticos, pigmentos no polares.

### INTRODUCTION

Carotenoids are non-polar pigments that are abundant in foods. Around 100 different carotenoids have been identified in fruits, vegetables, grains, tubers and bulbs, where they mainly accumulate as liquid-crystalline forms in tubular chromoplasts or solid crystals in crystalloid chromoplasts, although the occurrence of lipid-dissolved carotenoids within globular chromoplasts also occurs in some plant foods (e.g., peach palm fruit and tangerine tomato) (Schweiggert and Carle, 2017). Carotenoids are pigments that confer yellow, orange and red colorations to plant foods, although

\*Autor para correspondencia: José de Jesús Ornelas Paz  
Correo electrónico: [jornelas@ciad.mx](mailto:jornelas@ciad.mx)

Recibido: 27 de julio de 2022

Aceptado: 17 de octubre de 2022

colorless carotenoids are also present (i.e., phytoene and phytofluene) (Schweiggert *et al.*, 2012). Overall, carotenoids are commonly tri- or tetraterpenes (30 and 40 carbon atoms) with a system of conjugated double bonds, which is involved in their biological activities (Desmarchelier and Borel, 2017). They can be linear structures or contain cyclized ends. They exist as free forms or esterified with fatty acids, sugars and proteins. They have been classified in carotenes and xanthophylls; carotenes are hydrocarbons and xanthophylls contain oxygenated groups (Britton, 2020).

Several beneficial effects on human nutrition and health have been attributed to carotenoids, including effects against several chronic diseases that are considered as public health problems, such as some cancer forms and cardiovascular diseases (Britton, 2020). These biological actions are performed by different mechanisms. Unfortunately, the beneficial effects of carotenoids are limited due to their low bioavailability, according to the low levels of circulating carotenoids commonly reported (Desmarchelier and Borel, 2017; Schweiggert and Carle, 2017). The absorption process for carotenoids is very complex and can be altered by various factors (Desmarchelier and Borel, 2017).

### Plant foods rich in carotenoids

Although carotenoids can be found in foods of animal origin, algae and microorganisms, plant foods represent the main source of carotenoids in the human diet. Only 40 carotenoids are significantly consumed by humans, however, only five are the most abundant carotenoids in human plasma (Desmarchelier and Borel, 2017). The most abundant carotenoids in green leafy vegetables are lutein and  $\beta$ -carotene (Table 1). Carotenes in green leafy vegetables can be found as protein-carotenoid complexes. The roots (e.g. sweet potatoes and carrots) are commonly rich in  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, with carrots being the most important source of  $\beta$ -carotene (where it accumulates as crystals) in human diet (Schweiggert and Carle, 2017). Fruits are rich in xanthophyll esters (e.g.,  $\beta$ -cryptoxanthin, zeaxanthin and lutein) and  $\beta$ -carotene, which are in non-crystalline form in the chromoplasts. Lycopene accumulates in tomato fruit as big crystals. The carotenoid content in commonly consumed fruits is shown in Table 1.

The carotenoid content in plant foods depends on many factors, especially on the ripening process. Ethylene, the ripening hormone, triggers carotenoid biosynthesis, causing in many cases, exponential increases in carotenoid content (Cervantes-Paz *et al.*, 2012). This process involves the degradation of chlorophylls and the transformation of chloroplasts in chromoplasts rich in carotenoids (Cervantes-Paz *et al.*, 2012). Any postharvest technology applied to preserve plant foods in postharvest may retard or compromise the biosynthesis of carotenoids. This is the case of the use of low temperatures, the modification of the gas composition surrounding the food (modified atmosphere packaging and controlled atmosphere storage), application of ripening inhibitors (e.g.,  $\text{KMnO}_4$  and 1-methylcyclopropene) or applica-

tion of phytosanitary treatments with heat or ionizing energy (Table 1) (Ornelas-Paz *et al.*, 2017; Yahia *et al.*, 2018).

Carotenoids do not accumulate homogeneously in plant foods, and their content also depends on genotype (Kljak *et al.*, 2015). The geographical origin of plant foods also alters the carotenoid content in foods, since it is influenced by environment temperature, exposition to light, and rain (Laurora *et al.*, 2021). Processing also alters significantly the carotenoid content in plant foods because carotenoids are prone to degradation, transformation or isomerization under light exposition, heating and alkaline or acid conditions. New processing techniques (e.g., pulsed electric fields, ultrasound, high hydrostatic pressures, high pressure homogenization, etc.) reduce the negative effects of conventional processing techniques on carotenoid content (López-Gámez *et al.*, 2021), however, mincing, chopping or homogenizing are enough to alter the carotenoid content in fruits and vegetables (Yahia *et al.*, 2018). Undoubtedly, other factors can alter the content of carotenoids in plant foods (Table 1).

### The carotenoid absorption process

The first step of the carotenoid absorption process implies the release of these compounds from foods during digestion (Figure 1) (Cervantes-Paz *et al.*, 2017). This step largely depends on the mechanical and chemical disruption of food by mastication, movements of the gastrointestinal tract, gastric acid, alkaline medium in the intestine, and digestive enzymes. Due to their lipophilic nature, the released carotenoids must then be incorporated into the lipids co-consumed with the carotenoid-rich food (Yahia *et al.*, 2018). The carotenoid-lipidic phase tends to emulsify with the aqueous content of the gastrointestinal tract. The lipid droplet size in this emulsion is large in the gastric phase, but it decreases in the intestinal phase of digestion due to the emulsifying action of bile salts secreted by gall bladder (Victoria-Campos *et al.*, 2013; Desmarchelier and Borel, 2017). This reduction of lipid droplet size is very important for lipid digestion, since lipases are hydrosoluble and only exert their action on lipid droplet surface (Cervantes-Paz *et al.*, 2017).

Lipid digestion influences the formation of micelles, which are structured by the products of lipid digestion (free fatty acids, diglycerides, monoglycerides, etc.), bile salts, phospholipids and cholesterol (Yahia *et al.*, 2018). Micelles are required for transportation of carotenoids from the chime to the enterocyte. Only micellarized carotenoids can be absorbed by intestinal cells (Cervantes-Paz *et al.*, 2017; Desmarchelier and Borel, 2017).

It must be stated that the distribution of carotenoids in lipid droplets depends on their polarity, with xanthophylls being located on droplet surface and carotenes in the core of the lipid droplets (Yahia *et al.*, 2018). Thus, the lipid digestion starts on the surface of the lipid droplet and therefore xanthophylls are more efficiently released and micellarized than carotenes. Micellarized carotenoids are considered as bioaccessible and represent the amount of carotenoids available in the required form to be absorbed by intestinal

**Table 1.** Carotenoid content ( $\mu\text{g/g}$  FW) in commonly consumed foods as affected by different factors.**Tabla 1.** Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g/g}$  FW) en alimentos en función de diferentes factores.

Food	Lyc	$\alpha\text{C}$	$\beta\text{C}$	Lut	Vio	Zea	$\beta\text{Cry}$
<b>Processing/storage</b>							
Mango (Fresh)			33 - 58*		9 - 11*		7 - 22*
Mango (CD: 50 - 70 °C)			13 - 33*		0 - 9*		2 - 14*
Orange Sweet Potato (Fresh)		0.78*	152*	1 - 4*		1 - 2*	
Orange Sweet Potato (B, R, and S)		0.6 - 0.8*	19 - 1333*	1 - 11*		1 - 6*	
Carrots (stored at - 15 °C to 50 °C)	38-89	0.6 - 1.4	33 - 44	0.5 - 1.5			
Cauliflower (Raw)		0.08-9.6	1 - 85	0.8 - 11		0.03 - 0.4	0.02 - 0.1
Cauliflower (B, R, S, and MW)		0.05 - 13	0.4 - 106	0.5 - 16		0.02 - 0.9	0.001 - 0.2
Apricot (Fresh)	150*	200*	250*	120*			250*
Apricot (H, F, and FD)	70 - 200*	100 - 240*	120 - 280*	110 - 250*			120 - 260*
Cherries (Fresh)	10*	20*	20*	20*			20*
Cherries (H, F, and FD)	10*	20*	20*	20*			20*
Nectarines (Fresh)	60*	90*	90*	100*			90*
Nectarines (H, F, and FD)	20 - 60*	30 - 90*	30 - 80*	40 - 90*			40 - 90*
Peaches (Fresh)	20*	30*	30*	30*			30*
Peaches (H, F, and FD)	20-30*	30 - 40*	30 - 40*	30 - 40*			30 - 40*
Plums (Fresh)	20*	30*	30*	30*			30*
Plums (H, F, and FD)	10 - 20*	20 - 30*	30 - 40	30 - 40*			30 - 40*
Carrots (Fresh)	280*	380*	440*	420*			450*
Carrots (H, F, and FD)	220 - 300*	310 - 360*	370 - 440*	360 - 900*			380 - 470*
Peppers (Fresh)	600*	700*	840*	760*			850*
Peppers (H, F, and FD)	430 - 750*	660 - 1020*	720 - 1300*	680 - 1310*			720 - 1300*
Mango (Fresh)		0.5 - 1.2	5.9 - 10	0.8	0.4 - 6.6	0.3 - 1.1	0.5 - 1.5
Mango (HHP: 592 MPa, 3 min)		0.9 - 1.1	8.6 - 17	0.8	0.4 - 5.9	0.5 - 1.6	0.5 - 2.1
Papaya (Fresh)		0.8	1.7	0	0.03	0	0.4
Papaya (HHP: 100 - 600 MPa, 5 min)		0.6 - 0.9	2.0 - 6.5	0 - 2.7	0.2 - 1.2	0 - 2.3	0.9 - 3.9
Carrots (Fresh)		2005 - 2132*	3312 - 3449*	242 - 253*		210 - 269*	271 - 336*
Carrots (HHP: 60 - 100 MPa, 5 min)		1307 - 2180*	2227 - 3983*	237 - 289*		327 - 392*	394 - 480*
Avocado paste (Fresh)		0.2	0.9	3.1		0.06	0.3
Avocado paste (HHP: 600 MPa, 3 min)		0.003 - 0.6	1.2 - 3.2	3.9 - 4.6		0 - 0.1	0.3 - 1.4
Cape gooseberry juice (Fresh)	1.5	2.1	3.3			3.4	4.0
Cape gooseberry juice (HP: 80 °C, 10 min)	1.6	2.2	3.2			3.3	4.4
Cape gooseberry juice (US: 10 - 40 W, 15 min)	2-3.2	3 - 4.2	3.2 - 6.2			4.2 - 5.8	5.5 - 7.7
Pumpkin juice (Fresh)	0.8 - 0.9	0.9 - 1.2	1.1 - 1.3			1.1 - 1.4	1.1 - 1.3
Pumpkin juice (US: 200 - 600 W)	0.8 - 1.2	1.1 - 1.6	1.1 - 1.7			1.2 - 1.8	1.2 - 1.8
Carrot juice (Fresh)		30.1	76.6	2.9			
Carrot juice (HPH: 100 - 150 MPa, 1.2 L/h)		30 - 32	75 - 80	2.1 - 2.8			
Carrots (Fresh)		0.15 - 0.2	0.45 - 0.5	0.18 - 0.2			
Carrots (PEF: 0.8 - 3.5 kV/cm-5 - 30 pulses)		0.2 - 0.4	0.4 - 1.0	0.01 - 0.3			
<b>Cultivar/variety</b>							
Mango (16 varieties)	1.1 - 4.6		0.4 - 13	0.03 - 1.4	0.01 - 12	0.2 - 0.6	
Carrots (10 varieties)		41 - 60	72 - 84	2.1 - 4.1			
	0 - 1400*	0 - 1000*	0 - 1400*	3-5000*			
Potato (72 cultivars)			0.002 - 0.6	0.06 - 4.7	0.06 - 5.0	0 - 0.05	
Corn (9 hybrids/cultivar)			0.6 - 2.1	0.2 - 16		0.7 - 19	0.3 - 3.1
Pumpkin (29 cultivars)	0.01 - 0.18		0.06 - 0.50	0.3 - 1.2			
			13 - 115*	33 - 389		3 - 192*	
<b>Food tissue</b>							
Mango (Peel)	0 - 2.5	0 - 8.0	13 - 45	0.3 - 2.8	3.0	1.0 - 13	0.2 - 6.0
Mango (Pulp)	0.03 - 6.0	0.09 - 12	6.4 - 45	0.6 - 0.7	0.23	1.0 - 6.0	0.1 - 1.7
Apricot (Peel)	0 - 1.8	0.1 - 8.0	6.7 - 198	1.7 - 18	0.09 - 1.1	0.1 - 1.6	0.6 - 19
Apricot (Flesh)	0 - 1.7	0.002 - 73	0.69 - 123	0.03 - 1.4	0.01 - 0.08	0 - 0.5	0.02 - 12
Peach (Peel)	146		0.02 - 46	0.02 - 0.13		0.01 - 0.13	0.01 - 0.05
Peach (Pulp)	93		0 - 226	0.1 - 2.0		0 - 1.5	0.062
Sweet potato (Peel)			137	21			
Sweet potato (Flesh)			364	47			
Tomato (Peel)	83		144	17			
Tomato (Flesh)	113		84	25			
Goldenberry (Pulp)			70*	3*			
Goldenberry (Peel)			150*	20*			
<b>Ripening stage</b>							
Avocado at 5 ripening stages		0.01 - 0.04	0.03 - 0.08	0.04 - 0.6	0.04 - 1.7		
Rosehip at 5 ripening stages	4 - 136*	0 - 13*	15 - 186*	14 - 112*		1.9 - 2.4*	
Mango at 6 ripening stages			14 - 41	0 - 3	0 - 4		0.6 - 1.7
<b>Pre-harvest factors</b>							
Melon (5 rootstocks)		5.7 - 11.2	6.3 - 117	0 - 13.7			
Papaya (11 locations on the island of Hawaii)				1.5 - 3.2			2.4 - 7.4
Brassica vegetables (bed, pot, field and tunnel)			0 - 68	0 - 105			
Leafy kale from Italy, Portugal, and Turkey			385 - 64*	536 - 615*			
Baby leaf lettuce (led light and blue led light)			0.2 - 2.9	0.09 - 2.8			

\*Values expressed in dry weight; FW: flesh weight; Lyc: lycopene;  $\alpha\text{C}$ :  $\alpha$ -carotene;  $\beta\text{C}$ :  $\beta$ -carotene; Lut: lutein; Vio: violaxanthin; Zea: zeaxanthin;  $\beta\text{Cry}$ :  $\beta$ -cryptoxanthin; CD: convective drying; B: boiling; R: roasted; S: steaming; MW: microwaving; H: heating; F: freezing; FD: freeze drying; HHP: high hydrostatic pressure; US: ultrasound treatment; HP: heat pasteurization; W: watts; PEF: pulsed electric fields; HPH: high-pressure homogenization. **Sources:** Conurso *et al.*, 2012; Dhliwayo *et al.*, 2014; Donado-Pestana *et al.*, 2012; Jacobo-Velázquez and Hernández-Brenes, 2012; Leong and Oey, 2012; Fernandez-Orozco *et al.*, 2013; Ferioli *et al.*, 2013; Reif *et al.*, 2013; Samuolienė *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Kljak and Grbeša, 2015; Ma *et al.*, 2015; Behnlian and Mayer-Miebach, 2017; Cao *et al.*, 2017; Ordoñez-Santos *et al.*, 2017; De Andrade Lima *et al.*, 2019; Kourouma *et al.*, 2019; Ranganath *et al.*, 2018; Kulczyński and Gramza-Michałowska, 2019; Elizondo-Montemayor *et al.*, 2020; Etzbach *et al.*, 2020; Fratianni *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020; Cervantes-Paz *et al.*, 2021; Diamante *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2021; Lara-Abia *et al.*, 2021; Laurora *et al.*, 2021; Lebaka *et al.*, 2021; López-Gómez *et al.*, 2021a; Viacava *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Suo *et al.*, 2022; Szczepanska *et al.*, 2022.



cells (Victoria-Campos *et al.*, 2013; Cervantes-Paz *et al.*, 2017). Micellarized carotenoids are transported to the brush border of enterocytes through the aqueous medium. The acidic medium of the unstirred water layer adjacent to the brush border of the enterocytes causes the dissociation of micelles and the liberation of carotenoids, which are passively taken by the enterocytes and facilitated diffusion and unilamellar or multilamellar vesicles of phospholipids (Reboul, 2013).

Currently, the quantity of micellarized carotenoids (bioaccessible carotenoids) is used as a measure of carotenoid absorption (bioavailability). The passive diffusion process is quickly saturated causing that most carotenoids are incorporated into the enterocytes by protein transporters (e.g. SR-BI, CD36, NPC1L1) (Reboul, 2013; Desmarchelier and Borel, 2017). Table 2 shows the bioaccessibility of carotenoids from several plant foods. In the enterocytes, the provitamin A carotenoids are converted in vitamin A esters. Then, the

non-provitamin A carotenoids, vitamin A and other compounds are packed in chylomicrons, which are evacuated to the lymphatic system and then to the bloodstream. Several transporters are involved in the intracellular flux of carotenoids, including CD36, NPC1L1, SR-BI, GSTP1, HR-LPB and fatty acid-binding proteins (Reboul, 2013). Chylomicrons exposed to the action of endothelial lipoprotein lipases in the bloodstream, lead to chylomicrons remnants, which are taken by the liver (Schweiggert and Carle, 2017; Desmarchelier and Borel, 2017).

Carotenoids are exported from liver to different tissues by lipoproteins. Carotenes (e.g.,  $\beta$ -carotene and lycopene) are transported by low-density lipoproteins (LDL) and very low-density lipoproteins, while xanthophylls (e.g., lutein, zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin) are transported by high-density lipoproteins and LDL (Desmarchelier and Borel, 2017; Meléndez-Martínez *et al.*, 2017). Carotenoids that are

**Table 2.** Bioaccessibility (%) of carotenoids from commonly consumed fruits and vegetables.

**Tabla 2.** Bioaccesibilidad (%) de carotenoides en frutas y hortalizas comúnmente consumidas.

Food	Phy and Phytff	Lut	Zea	Neox	Viol	$\beta$ Cry	$\alpha$ C	$\beta$ C	Lyc	Carotenes	Xanthophylls ester	TC
Tomatoes	5 - 43	9 - 59						0.5 - 57	0.3 - 4	0.5 - 18		2 - 12
Carrots	17 - 64	0 - 41			0		3 - 7	4 - 22	39			2 - 7
Spinach		4 - 38		22	3		20	3 - 47				19
Kale		8 - 100						1 - 10				0.1
Lettuce		11 - 18						6 - 16				
Broccoli		1 - 38					0	7 - 54				0.1
Pepper		17 - 98	73 - 77	8	4 - 39	30 - 45	1	7 - 21			0 - 41	
Pumpkin		10 - 14						25 - 35				
Butternut squash		16			4		18	17				
Sweet potato								14				
Avocado		0.4 - 2		0.4 - 1	1 - 15			9 - 11				
Mango		14			19			4 - 32				
Papaya			2		0.6	3 - 9		0.6 - 6	0.3	0 - 20	0.3	
Melon		34	50					7				
Watermelon	64				0			30	3			
Orange juice	8 - 10	103	9		2.7	98		6 - 34	100	6 - 7		23
Mandarins	10 - 72					33 - 42		16 - 36		8 - 36	0 - 37	

**Abbreviations:** TC = total carotenoids;  $\beta$ C =  $\beta$  - carotene;  $\alpha$ C =  $\alpha$  - carotene;  $\delta$ C =  $\delta$  - carotene;  $\gamma$ C =  $\gamma$  - carotene; Lut = lutein; Lyc = lycopene; Zea= zeaxanthin;  $\beta$ Cry =  $\beta$  - cryptoxanthin; Viol = violaxanthin; Phy = phytoene; Phyt = phytofluene; Carotenes includes  $\alpha$ C,  $\beta$ C, Lyc. **Sources:** Ornelas - Paz *et al.*, 2010; Jeffery *et al.*, 2012; Schweiggert *et al.*, 2012; Victoria-Campos *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Petry and Mercadante, 2017; Bergantin *et al.*, 2018; González-Casado *et al.*, 2018; Mapelli-Brahm *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; de la Fuente *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Zhong *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2020; Eitzbach *et al.*, 2020; Hayes *et al.*, 2020; Cervantes-Paz *et al.*, 2021; Iddir *et al.*, 2021; Lara-Abia *et al.*, 2021; Laurora *et al.*, 2021; López-Gámez *et al.*, 2021a; López-Gámez *et al.*, 2021b; Schmidt *et al.*, 2021.

being absorbed, metabolized, stored and/or employed by the organism are considered as bioavailable (Desmarchelier and Borel, 2017). The general process for carotenoids absorption is shown in Figure 1.

### Factors affecting the carotenoid absorption process

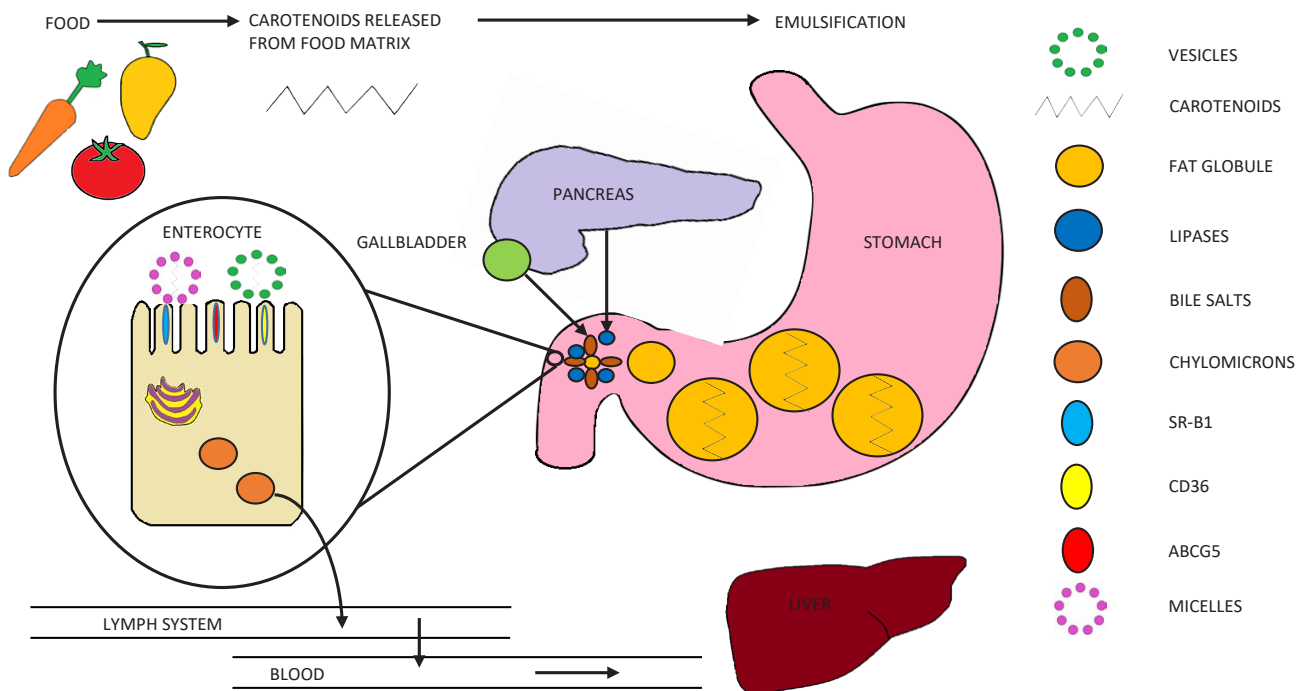
The micellization of carotenoids, which is a key step for carotenoid bioavailability, is affected by many factors (Tables 3 and 4). The food matrix is the most important factor affecting the bioaccessibility/bioavailability of carotenoids (Victoria-Campos *et al.*, 2013; Cervantes-Paz *et al.*, 2017). The term "food matrix" refers to the combined effects of all factors associated with a food that improve or reduce the bioavailability of carotenoids (Cervantes-Paz *et al.*, 2017). This explains why the bioaccessibility/bioavailability of carotenoids from simple foods (e.g., supplements) is higher than that of complex plant foods. The form in which carotenoids are present in foods determines their bioaccessibility/bioavailability.

Carotenoids present in foods as lipid-based forms, are readily released from the food and then incorporated into the oily phase of chyme, as compared to carotenoid crystals or carotenoid-protein complexes (Schweiggert and Carle, 2017). That is the reason why  $\beta$ -carotene from some fruits (e.g., tomatoes and mango) is more bioavailable than  $\beta$ -carotene from carrots or spinach (Ornelas-Paz *et al.*, 2010).

Food processing alters the effect of food matrix. Cooking and mincing favor carotenoid release from food during digestion, increasing the micellization and absorption of these compounds (Table 3) (Li *et al.*, 2016; Eriksen *et al.*, 2017; De Oliveira *et al.*, 2020). Industrial processing also increases the bioaccessibility of food carotenoids (Dhuique-Mayer *et*

*al.*, 2018; Mapelli-Brahm *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2019). Non-thermic technologies (e.g., high hydrostatic pressurization, high pressure homogenization, pulsed electric fields and ultrasound) also increase the bioaccessibility of carotenoids (Lara-Abia *et al.*, 2021; López-Gómez *et al.*, 2021). The increase of carotenoid bioaccessibility is a consequence of the processing-mediated softening of food (cellular disruption). Ripening also causes softening of fruits, favoring the release of carotenoids during digestion. However, ripening also favors the esterification of carotenoids with fatty acids, reducing their polarity and, consequently, their micellization rate and bioavailability (Cervantes-Paz, *et al.*, 2012; Victoria-Campos *et al.* 2013).

On the other hand, the fiber from carotenoid-rich food or co-consumed foods alters the carotenoids micellization and bioavailability (Table 4). Overall, fiber reduces the absorption of carotenoids by altering of the macro- and microviscosity of chyme. This alteration reduces the emulsification of lipid droplets favoring the formation of large ones, and reduces the activity of lipase, formation of micelles, the transference of carotenoids from lipid droplets to micelles and the diffusion of carotenoid-rich micelles to the enterocyte (Cervantes-Paz *et al.*, 2016). Low concentrations of pectin in the chyme (~ 2 %) can cause high reductions in carotenoid bioavailability (20 - 50 %) (Rock and Swendseid, 1992). This effect depends on the physicochemical characteristics of fibers (solubility, molecular weight, degree of esterification, etc.), with soluble fibers exerting the most negative effect on carotenoid absorption (Cervantes-Paz *et al.*, 2016; Cano *et al.*, 2019).



**Figure 1.** Overview of the carotenoid absorption process.

**Figura 1.** Diagrama general del proceso de absorción de carotenoides.

**Table 3.** Effect of thermic and non-thermic food processing on carotenoid bioaccessibility (BA).

**Tabla 3.** Efecto del procesamiento térmico y no térmico en la bioaccesibilidad (BA) de carotenoides.

Food source	Treatment	Bioaccessibility (BA)
<b>Cooking treatments</b>		
Spinach	Raw and steamed (100 °C/3 min)	BA of Lut and $\beta$ C was higher with steamed (16.8 - 21.7 % and 5.6 - 6.2 %, respectively) than with raw (5.3 - 6.4 % and 2.0 - 3.5 %, respectively) tissues
Lettuce	Raw and boiled (98 °C/ 20 min)	BA of $\beta$ C and Lut from raw lettuce was 8.5 - 13 % and 5 - 11 % higher than with cooked samples
Tomatoes	Boiled (100 °C/10 min) and digested in absence and presence of an emulsion containing 4 % of olive oil	BA of TC was higher in boiled samples with fat than in raw tissues without fat. Boiling $\uparrow$ the BA of TC (45 - 72 %) in digestions with and without fat
Jalapeño peppers	Raw, boiled (94 °C /12.5 min) and grilled (210 °C /13.2 min)	BA of free xanthophylls from red peppers followed the order of raw > grilled > boiled. Cooking methods did not influence clearly the BA of carotenoids from green peppers.
<b>Industrial thermal-treatments</b>		
Orange-fleshed sweet potato (OFSP) based baby puree and pumpkin products	Homemade steaming (HM-100 °C), PAST (100 °C/15 min), blanching (BP- 90 °C/3 min+PAST), blanching and sterilization (BS) and sterilization at 123 °C/30 min (S) and commercial baby food (CBF-OFSP)	BA of $\beta$ C $\uparrow$ with the intensity of the thermal treatment (BS and CBF-OFSP (5 - 6 %) > BP and S (3 - 4 %) > HM and PAST (0.5 - 1 %)). BA of <i>cis</i> - $\beta$ C also was higher in S, BS and CBF-OFSP samples than in BP (29 %), HM (6 %) and P (0 %) treated samples
Mature pinalate orange juice	Fresh, UF and thawed at room temperature (UF-RT), in the fridge (UF-FG), or in MW (UF-MW) and PAST	Thermal processing $\uparrow$ the BA of TC in the order of PAST (26 %) > UF-MW (18 %) > UF-RT (14 %) > UF-FG (12 %) > Fresh (8 %). All treatments $\uparrow$ the BA of carotenes (~ 238 %), but only 49 % for UF - FG samples. The effect of treatments was variable in the BA of xanthophylls
Tomato and Kale juices	Raw and treated with TT (90 °C/30 s), OH (13 V/cm/ 60 Hz/ 90 °C/30 s) and PEF (35 kV/cm)	In tomato juices, PEF significantly $\downarrow$ and $\uparrow$ the BA of $\beta$ C (50 %) and Lyc (2.5 times), respectively. OH and TT did not influence the BA of $\beta$ C and Lyc. The BA of $\beta$ C and Lut from kale juices was not significantly influenced by treatments
Fresh carrot, sweet potato, yellow bell pepper and broccoli florets	Fresh and HAD (60, 70, 80 °C) samples with or without 5 % (w/w) of olive oil	In carrots, HAD $\uparrow$ the BA of Lut, $\alpha$ C and $\beta$ C (33 - 42 %, 62 - 141 % and 217 - 256 %, respectively). HAD $\uparrow$ 1.4 - 23 times the BA of Lut, $\alpha$ C and $\beta$ C from bell peppers. For sweet potato and broccoli florets, HAD $\uparrow$ the BA of $\alpha$ C and $\beta$ C (9 - 136 %) with olive oil. HAD $\downarrow$ the BA of Lut, $\alpha$ C and $\beta$ C (9 - 74 %) in absence of oil
<b>Non-thermal emerging technologies</b>		
Sweet Mary papaya	Cubes (1 cm <sup>3</sup> ) treated with HHP (100, 350 and 600 MPa) at 26.2 °C for come-up time (CUT) and holding time (HT) of 5 min	The highest BA of carotenoids was observed for samples treated with HHP at 350 MPa/CUT and 350 MPa/5 min (1.4 % and 1.1 %, respectively). The lowest BA was observed at 100 MPa/5min (0.4 %) and 600 MPa/5 min (0.6 %)
Persimmon	Control (freeze-dried pulverized fruit), PAST (85 °C/15 min) and HHP (200 MPa/25 °C/6 min)	Carotenoids were only bioaccessible in samples treated with HPP and PAST. The most bioaccessible were $\beta$ Cry - laurate (23.9 - 36.9 %), $\beta$ Cry (11.6 - 54.2 %), Ant (18.4 - 30.1 %) and Lyc (17.2 - 27.2 %) and HPP caused the highest bioaccessibility. In HPP treated samples, all- <i>trans</i> and 13- <i>cis</i> $\beta$ C were highly bioaccessible (19.3 % and 16.4 %, respectively)
Valencia orange juice	Untreated and treated juices with HPP (600 MPa/3 min), PEF (12.7 kV/cm / 107.4 kJ/L/61 Hz), Low PAST (LP - 73.9 °C/ 30 s), Conventional PAST (CPAST- 92.2 °C/31 s) and Hot filling (HF) (CP + filling at 82.3 °C). All treatments with/ without US (65.7 - 68.3 W/cm <sup>2</sup> /29.5 - 30.7 °C)	BA of carotenoids was higher (41 - 51 %) in juices treated with US than in non-sonicated samples (19 - 24 %). PAST techniques did not affect significantly the BA of TC, however, treatments at higher temperatures (CPAST and HF) $\downarrow$ BA, especially that of TC, epoxy carotenoids, diepoxy carotenoids and esterified carotenoids
Tomato puree	Untreated and treated with PEF (0.4, 1.2 and 2 kV cm <sup>-1</sup> ; 5, 18 and 30 pulses) in presence of olive oil (5 %)	The highest BA of TC (17.1 %), $\beta$ C (21.6 %), $\gamma$ C (34.5 %), Lut (21.4 %), $\delta$ C (18.4 %) was observed with puree treated with 5 pulses at 2 kV m <sup>-1</sup> . Lyc BA was equally enhanced by treatments at 1.2 and 2 kV cm <sup>-1</sup> (9.7 % and 9.5 %, respectively). The BA of more polar carotenoids, Phyt and Phy was higher in untreated tomatoes. The number of pulses did not affect significantly the carotenoid BA
Carrots	Untreated puree and treated with PEF (5 pulses of 3.5 kV cm <sup>-1</sup> ), TT (70 °C/10 min), PEF and TT (PEF/TT). Samples were digested in presence of olive oil (5 %)	All treatments $\uparrow$ carotenoid BA (PEF/TT (245.5 - 296 %), PEF (231.8 - 256 %) and TT (66.7 - 100 %)). The impact of treatments was similar for all carotenoids
Mango (peels and paste)	Untreated and treated with US (300 W/cm <sup>2</sup> )	US $\uparrow$ BA of $\beta$ Cry (44 - 47 %), Lut (35 - 46 %) and $\beta$ C (33 - 44 %) from peels. The impact of US on carotenoid BA was higher for paste than for peels.
Kale	Untreated samples and treated with HPP (200, 400 and 600 MPa for 5, 10, 40 min)	Higher pressures and extended holding periods $\uparrow$ the BA of individual carotenoids from 28.5 up to 78.6 % (600 MPa/40 min)
Tomato juice	Fresh and treated with HPP (200, 300, 400, 500 bar) and US (200, 400, 600, 800 W for 20 min, 50 $\mu$ m of amplitude and 10 s interval)	BA of total all- <i>trans</i> and <i>cis</i> isomers of Lyc was higher for juice treated with HPP at 500 bar (6.9 and 13.4 %, respectively) and US at 800 W (9.7 and 15.8 %, respectively). BA of total Lyc was higher with HPP at 500 bar and US at 800 W (1.4 and 1.8 times higher than with fresh samples, respectively). BA of $\zeta$ C was not affected by treatments

**Abbreviations:** UF = ultrafrozen; MW= microwave oven; PAST = Pasteurized; OH = Ohmic heating; PEF= Pulsed electric field; HPP= high pressure processing; HHP = High hydrostatic pressurization; US = ultrasonication; HPH = high-pressure homogenization; HAD = hot air drying; TT = thermally-treated; BA = bioaccessibility; TC = total carotenoids;  $\beta$ C =  $\beta$ -carotene;  $\alpha$ C =  $\alpha$ -carotene;  $\zeta$ C =  $\zeta$ -carotene;  $\delta$ C =  $\delta$ -carotene;  $\gamma$ C =  $\gamma$ -carotene; Lut = lutein; Lyc = lycopene;  $\beta$ Cry =  $\beta$ -cryptoxanthin; Viol = violaxanthin; Ant = antheraxanthin; Phy = phytoene; Phyt = phytofluene. **Sources:** Victoria-Campos *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Eriksen *et al.*, 2017; Mercado-Mercado *et al.*, 2017; Dhuique-Mayer *et al.*, 2018; González-Casado *et al.*, 2018; Mapelli-Brahm *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Cano *et al.*, 2019; Zhong *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; de Oliveira *et al.*, 2020; Eitzbach *et al.*, 2020; Lara-Abia *et al.*, 2021; López-Gómez *et al.*, 2021.

**Table 4.** Modifiers of carotenoid bioaccessibility (BA).**Tabla 4.** Modificadores de la bioaccesibilidad (BA) de carotenoides.

Digested food	Modifier	Bioaccessibility (BA)
Goji and spinach	Coconut oil (1 %)	Coconut oil ↑ the BA of Zea from 6.7 % to 13.3 %
Whole, peel and flesh persimmon	Whole-fat (WFM) and skimmed (SM) milks	BA of TC was higher with WFM than with SM, especially in digestions with whole fruit (2.74 times) than with flesh and peels (0.05 - 0.26 times higher)
Frozen Cajá pulp - based beverages	Water (W), SM or WFM, with/without sugar-cane (7 %)	Sugar enhanced the BA of all carotenoids, in the order W (27 %) > SM (22 %) > WFM (15 %)
Commercial milk - fruit juices	Skimmed milk, vitamins (C, D, A, E, B <sub>6</sub> ), sugars, and gelling agents	Beverages containing pectin showed greater BA values (40.7 %) than those containing arabic, xanthan or guar gums (7.4 %)
<i>B. gasipaes</i> fruits	Lyophilized peach palm, oil-in-water (O/W) food emulsion	BA of TC, all - <i>trans</i> - βC, all - <i>trans</i> - Lyc and all - <i>trans</i> - γC was 11 - 21 times higher in digestions with food emulsion than with the lyophilized fruit
Tomato products	3 ripening stages (mature-green, pink and red), 5 % oil (coconut, olive and sunflower oils) and two disruption levels (puree and cubes)	BA of TC and Lyc followed the order red > pink > mature-green (0 %). Olive oil ↑ 11 - 15 times the BA of TC and Lyc and sunflower and coconut oils between 7- and 11-times vs digestions without oil. BA of TC and Lyc was higher (46 - 251 %) from tomato puree than from cubes
Spinach	Mg (0, 200, 400 mg/mL), canola oil, coffee creamer with 10 % fat and bile extract (1 or 8 mM)	Mg ↓ the BA of TC, Lut and βC. Coffee creamer ↑ more the BA of carotenoids than canola oil (0.1 - 4.3 % vs 0 - 1.9 % respectively), especially with bile extract at 8 mM
Pure Lyc, βC and Lut	WPI, SPI, SC, GEL (0, 10, 25, and 50 % of the protein RDA)	WPI ↑ the BA of βC and Lyc, but ↓ the BA of Lut. SPI ↓ the BA of Lut and Lyc (up to 41.0 and 14.3 %, respectively) and ↑ the BA of βC (35 - 37 % at 10 and 25 % of the RDA). SC and GEL ↓ the BA of Lut (up to 62.9 % - 63.4 %) and ↑ that of βC (36.6 - 49.8 %)
Spinach, tomato juice and carrot juice	WPI, SPI, SC, GEL, turkey, and cod (0, 10, 25 and 50 % of the protein RDA)	Proteins ↑ the BA of TC (1.1 %) from tomato juice but ↓ that of TC from carrot juice and spinach (2.1 - 2.8 %). Proteins ↓ the BA of Lut and Zea from all foods. Proteins ↑ the BA of βC from juices (at 25 and 50 % of the RDA)
Carrot juice (CJ), apricot nectar (AN), tomato juice (TJ), frozen spinach (FS), field salad (FSD)	Ca (0, 250, 500, 1000 mg/L), Mg (0, 100, 200, 300 mg/mL), Na (0, 375, 750, 1500 mg/L) and Zn (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/L)	The highest concentrations of Ca and Mg inhibited the BA of carotenoids. Na ↑ the BA of carotenoids. Zn ↑ the BA of βC from FSD and FS but ↓ the BA of βC from AN, CJ and TJ. Na ↓ the BA of xanthophylls from FSD but Zn ↑ their BA. Na and Zn did not affect the BA of xanthophylls from FS. BA of Lyc, Phyt and Phyt from TJ ↓ as the concentration of Ca and Mg ↑, while the highest level of Na and Zn ↑ slightly their BA

**Abbreviations:** BA = bioaccessibility; TC = total carotenoids; βC = β-carotene; αC = α-carotene; Lut = lutein; Lyc = lycopene; Zea = zeaxanthin; βCry = β-cryptoxanthin; Phy = phytoene; Phyt = phytofluene; RDA = recommended dietary allowance; WPI = Whey protein isolate; SPI = soy protein isolate; SC = sodium caseinate; GEL = gelatin. **Sources:** Corte-Real *et al.*, 2017; da Costa and Mercadante 2017; García-Cayuela *et al.*, 2017; Hempel *et al.*, 2017; Corte-Real *et al.*, 2018; González-Casado *et al.*, 2018; Stinco *et al.*, 2019; De Souza *et al.*, 2020; Iddir *et al.*, 2021.

The amount and type of fat consumed with carotenoids alter the absorption rate of carotenoids (Table 4), since the latter are poorly absorbed in absence of fat. The minimum amount of fat required for carotenoid absorption is unknown. Some studies have suggested that at least 3-5 g of fat per meal are required for good carotenoid absorption, although higher quantities of fat per meal (e.g., 20 g) have also been proposed (Goltz *et al.*, 2012). The positive effect of fat on carotenoid absorption depends on carotenoid type, with zeaxanthin, α-carotene, and β-carotene requiring more fat than lutein to reach the highest micellarization values (Hempel *et al.*, 2017; González-Casado *et al.*, 2018; De Souza *et al.*, 2020). Fat consumption can increase the absorption of carotenoids by 2-3 times or even more, depending on carotenoid type. The beneficial effect of fat on carotenoid micellarization and absorption also depends on fat type, with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids best promoting the bioaccessibility of carotenoids than saturated fatty acids (Goltz *et al.*, 2012; Victoria-Campos *et al.*, 2013).

Protein improves the bioaccessibility of dietary carotenoids due to its emulsifying properties (Iddir *et al.*, 2021). The carotenoid dose also influences the carotenoid absorption rate, with low doses resulting in a higher carotenoid absorption than large doses (Yahia *et al.*, 2018). Under gastrointestinal conditions, there is a competence among carotenoids for absorption, thus the inclusion of a new carotenoid in the diet will cause a reduction in the absorption of other carotenoids. In some cases, the inclusion of xanthophylls causes a decrease in carotene absorption while in other cases the opposite has been observed (Kopec and Failla, 2018). The effect of some modifiers on carotenoid bioaccessibility is shown in Table 4.

### Beneficial effects of carotenoids on human health

Carotenoids are able to neutralize free radicals, which can damage molecules in cells and cause degenerative diseases in humans. Abnormal levels of free radicals in the human body cause oxidative stress, which has been associated



with the pathogenesis of more than 100 different diseases (Yahia *et al.*, 2018). Carotenoids can neutralize several oxygen reactive species, including singlet oxygen and peroxy radicals (Britton, 2020). This antioxidant activity depends on their number of conjugated double bonds and oxygenated substituents (Yahia *et al.*, 2018), and involves the binding of carotenoids to free radicals and the transference of energy from the free radical to the carotenoid (Swapnil *et al.*, 2021). Lycopene, canthaxanthin and astaxanthin show a higher antioxidant activity than  $\beta$ -carotene and zeaxanthin. Several studies have demonstrated that the antioxidant activity of carotenoid mixtures is higher than that of individual carotenoids, demonstrating the synergistic effects of carotenoids (Rowles and Erdman, 2020).

The consumption of some carotenoids has been associated with a reduced risk of some forms of cancer (Table 5). The carotenoid with the highest anticancer effect seems to be lycopene, independently if it is consumed in purified

form or from tomato products. Lycopene is highly effective in the prevention of prostate cancer, although consumption of lycopene has also been related to the protection against other cancer forms (digestive tract, pancreatic, cervical, etc.) (Lu *et al.*, 2015; Bakker *et al.*, 2016; Van Hoang *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018; Swapnil *et al.*, 2021).

The effects of other carotenoids in cancer prevention are less clear. There is some evidence that lycopene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin prevent lung cancer (Iskandar *et al.*, 2016).  $\beta$ -Carotene,  $\alpha$ -carotene and lutein have shown protective effects against breast cancer (Bakker *et al.*, 2016).  $\beta$ -Carotene, lycopene,  $\beta$ -cryptoxanthin, lutein and zeaxanthin prevent pharyngeal, laryngeal and pancreas cancers (Rowles and Erdman, 2020). Lycopene reduces the risk of gastric and prostate cancer (Van Hoang *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018).  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -Carotene reduce the risk of colorectal cancer (Lu *et al.*, 2015). The anticancer effects of carotenoids have been attri-

**Table 5.** Carotenoids and health.

**Tabla 5.** Carotenoides y salud.

Disease / type of study	Population or studied subjects	Effect*
Gastric cancer (GC) / case-control study	415 cases and 830 controls	Case group consumed significantly less TC, $\beta$ C, $\beta$ Cry, Lyc, tomato, and ketchup than control group. TC intake in women and an overall intake of Lyc were inversely associated with GC risk
Breast cancer (BC) / case-control study	1502 cases (BC), 462 estrogen receptor-negative (ER-) and 1502 controls (C)	The highest $\alpha$ C (198 - 1520 vs 14 - 57 nmol/L) and $\beta$ C (1067 - 7699 vs 29 - 348) plasma levels were inversely associated with the risk of ER - BC
Colorectal cancer (CC) / case control study	845 cases (CC) and 845 controls	The intake of carotenoids was inversely related with the risk of CC in the order of $\beta$ Cry (110 - 167 vs 42 - 68 $\mu$ g/day) > Lyc (841 - 1278 vs 223 - 379 $\mu$ g/day) and $\alpha$ C (770 - 1065 vs 207 - 355 $\mu$ g/day) > $\beta$ C (7856 - 9164 vs 3818 - 4299 $\mu$ g/day). The effect of $\beta$ C was only observed in males
Prostate cancer (PC) / case control study	244 cases PC and 408 controls	The intake of Lyc (>1200 vs <648 $\mu$ g/day), tomatoes (> 16.5 vs < 7.1 g/day) and carrots (> 3.2 vs < 1 g/day) was inversely related with the risk of PC
Head and neck cancer (HNC) / Cohort Study	120,852 participants, 3898 subcohort members	Inverse association between the intake of vitamin E and carotenoids and incidences of HNC and HNC subtypes
Congestive heart failure (CHF) / Longitudinal population-based study	Data from 1031 participants in the Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study from Finland – followed prospectively for > 17 y	The lowest serum $\beta$ C concentration increased the hazard ratio of CHF ( $\leq$ 0.22 vs > 0.46 $\mu$ mol/L). The lowest levels of serum $\beta$ C and Lyc increased the risk of death for coronary heart disease
Cardiovascular diseases (CDVs) / cross-sectional study	1350 healthy adults from Japan	Serum levels of TC were inversely associated with baPWV, SBP, DBP, HOMA-IR, blood insulin, FBG, TGs and cholesterol in males, and with seven biomarkers (BMI, baPWV, SBP, HOMA-IR, blood glucose, FBG, TGs and cholesterol) in females. In both sex, TC had a positively association with HDL while Lyc was inversely associated with baPWV and positively associated with HDL. In males, serum Lut was negatively associated with HOMA-IR and insulin
Cardiovascular diseases (CDVs) / Meditation analyses using US national data from the NHANES	Data from 1312 men and 1544 women participating in the NHANES 2003-2006	CRP and tHcy were inversely associated with serum concentration of TC. LDL were inversely associated with Lut/Zea. HDL cholesterol had a positive association with serum $\alpha$ C, $\beta$ Cry, Lut/Zea and TC. $\beta$ C was inversely associated with the CRP levels
Type 2 Diabetes (T2D) / Cohort study	37,846 participants of the European Prospective Investigation from Netherlands	$\beta$ C (2.8 - 4.3 vs 1.1 - 1.7 mg/day) and $\alpha$ C (0.4 - 1.1 vs 0.2 - 0.4 mg/day) were inversely associated with the risk of T2D
Alzheimer dementia (AD) / A community-based cohort	927 older adults (81 y) participating in the Rush Memory and Aging Project followed prospectively for 7 y	TC (24.8 vs 6.7 mg/day) and Lut/Zea (0.37, 8.1 vs 1.2 mg/day) were inversely related with the risk of AD. $\beta$ C and $\beta$ Cry were inversely related with the HR of AD. TC, Lut and Lyc were inversely related with global AD pathology and individual disease indicators

\*All effects in the table were reported as statistically significant trends ( $p < 0.05$ ) in original papers. **Abbreviations.** TC = total carotenoids;  $\beta$ C =  $\beta$ -carotene;  $\alpha$ C =  $\alpha$ -carotene; Lut = lutein; Lyc = lycopene; Zea = zeaxanthin;  $\beta$ Cry =  $\beta$ -cryptoxanthin; BMI = body mass index; baPWV = brachial ankle pulse wave velocity; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; HOMA-IR = Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; FBG = fasting blood glucose; TG = triglyceride; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein; CRP = C-reactive protein; tHcy = total homocysteine. **Sources:** Karppi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Curhan *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Sluijs *et al.*, 2015; Munter *et al.*, 2015; Bakker *et al.*, 2016; Van Hoang *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019; Matsumoto *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2021.

buted to their antioxidant properties, the alteration of genes expression involved in the pathogenesis, alterations in the levels of signaling molecules and other effects (Rowles and Erdman, 2020).

The effect on carotenoid consumption on cardiovascular diseases is unclear, as both positive and negative effects have been reported (Table 5). There are some evidences suggesting that  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin, astaxanthin, among others, might prevent the development of cardiovascular diseases (Karppi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Kulczyński *et al.*, 2017; Matsumoto *et al.*, 2020). The effects of lycopene and  $\beta$ -carotene on cardiovascular diseases has been highly studied. The antioxidant activity of carotenoids seems to be associated with their beneficial effect on prevention of cardiovascular diseases, however, other mechanisms seem to be involved, including the carotenoid-related reduction of the inflammatory response caused by the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), maintaining endothelial nitric oxide bioavailability, altering the expression of some genes, inhibiting leucocyte adhesion and migration, reducing apoptosis, inhibiting macrophages activation, regulating cholesterol synthesis, inhibiting platelet activation, regulating the levels of lipoproteins, among others (Kulczyński *et al.*, 2017). The consumption of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -carotene also is inversely related to type 2 diabetes risk (Sluijs *et al.*, 2015). A neuro-protective effect was recently associated with the intake of total carotenoids, lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, and  $\beta$ -Carotene (Yuan *et al.*, 2021).

Lutein and zeaxanthin are important components of macula and retina and their levels in these tissues have positively been associated with visual functions (García-Romera *et al.*, 2022). These effects have been clearly demonstrated in clinical trials. Lutein and zeaxanthin absorb blue light, exert antioxidant effects, improve vision and prevent the development of cataracts and age-related macular degeneration (Yahia *et al.*, 2018). Interestingly, the levels of these carotenoids in the macula can be used as markers of their concentrations in the brain and cognitive functions (García-Romera *et al.*, 2022).

$\beta$ -Carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, zeaxanthin, lycopene, si-phonaxanthin, fucoxanthin, astaxanthin, crocetin and crocin, and some of their conversion products, are able to reduce the adiposity in animals and humans (Bonet *et al.*, 2020), by influencing adipocyte differentiation, oxidation rate of fatty acids and thermogenesis (Bonet *et al.*, 2015).

Also, carotenoids can reduce liver damage, due to their antioxidant and anti-inflammatory effects as well as the modulation of the expression of genes (Yahia *et al.*, 2018). Other beneficial effects of carotenoids include the protection of photodamage of skin, cytoprotection against mycotoxins, human growth, reproduction and immune function, among other beneficial effects (Yahia *et al.*, 2018; Swapnil *et al.*, 2021). Table 5 summarizes the results of some recent epidemiological studies on the effect of carotenoids on human health.

## CONCLUSIONS

Fruits and vegetables represent the most important source of carotenoids in the human diet. These compounds are able to exert many protective effects on human health, which are limited by the low absorption of these compounds in the intestinal tract. Food processing can increase the bioavailability of carotenoids, although processing causes a negative effect on carotenoid content. Further research is needed in order to clarify the beneficial effects of carotenoids on human health and the mechanisms involved in such effects.

## REFERENCES

- Bakker, M.F., Peeters, P.H., Klaasen, V.M., Bueno-de-Mesquita, H.B., Jansen, E.H., Ros, M.M., Travier, N., Olsen, A., Tjønneland, A., Overvad, K. and Rinaldi, S. 2016. Plasma carotenoids, vitamin C, tocopherols, and retinol and the risk of breast cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort, 2. The American Journal of Clinical Nutrition. 103(2): 454-464.
- Behnsilian, D. and Mayer-Miebach, E. 2017. Impact of blanching, freezing and frozen storage on the carotenoid profile of carrot slices (*Daucus carota* L. cv. Nutri Red). Food Control. 73: 761-767.
- Bergantin, C., Maietti, A., Tedeschi, P., Font, G., Manyes, L. and Marchetti, N. 2018. HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS determination of major carotenoids and their bioaccessibility from "Delica" (*Cucurbita maxima*) and "Violina" (*Cucurbita moschata*) pumpkins as food traceability markers. Molecules. 23(11): 2791.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Galmés, S., Serra, F. and Palou, A. 2020. Carotenoids and carotenoid conversion products in adipose tissue biology and obesity: Pre-clinical and human studies. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1865(11): 158676.
- Britton, G. 2020. Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1865: 158699.
- Cano, M.P., Gómez-Maqueo, A., Fernández-López, R., Welti-Chanes, J. and García-Cayuela, T. 2019. Impact of high hydrostatic pressure and thermal treatment on the stability and bioaccessibility of carotenoid and carotenoid esters in astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb, var. Rojo Brillante). Food Research International. 123: 538-549.
- Cao, S., Liang, M., Shi, L., Shao, J., Song, C., Bian, K., Chen, W. and Yang, Z. 2017. Accumulation of carotenoids and expression of carotenogenic genes in peach fruit. Food Chemistry, 214, 137-146.
- Cervantes-Paz, B., Yahia, E.M., Ornelas-Paz, J.J., Gardea-Béjar, A.A., Ibarra-Junquera, V. and Pérez-Martínez, J.D. 2012. Effect of heat processing on the profile of pigments and antioxidant capacity of green and red Jalapeño peppers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60(43): 10822-10833.
- Cervantes-Paz, B., Ornelas-Paz, J.J., Pérez-Martínez, J.D., Reyes-Hernández, J., Zamudio-Flores, P.B., Rios-Velasco, C., Ibarra-Junquera, V. and Ruiz-Cruz, S. 2016. Effect of pectin concentration and properties on digestive events involved on micellarization of free and esterified carotenoids. Food Hydrocolloids. 60: 580-588.

- Cervantes-Paz, B., Ornelas-Paz, J.J., Ruiz-Cruz, S., Rios-Velasco, C., Ibarra-Junquera, V., Yahia, E.M. and Gardea-Béjar, A.A. 2017. Effects of pectin on lipid digestion and possible implications for carotenoid bioavailability during pre-absorptive stages: A review. *Food Research International*. 99: 917-927.
- Cervantes-Paz, B., Yahia, E.M., Ornelas-Paz, J.J., Victoria-Campos, C.I., Pérez-Martínez, J.D. and Reyes-Hernández, J. 2021. Bioaccessibility of fat-soluble bioactive compounds (FSBC) from avocado fruit as affected by ripening and FSBC composition in the food matrix. *Food Research International*. 139: 109960.
- Concurso, C., Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Crinò, P., Paratore, A. and Romano, D. 2012. Effects of different rootstocks on aroma volatile compounds and carotenoid content of melon fruits. *Scientia Horticulturae*, 148: 9-16.
- Corte-Real, J., Bertucci, M., Soukoulis, C., Desmarchelier, C., Borel, P., Richling, E., Hoffmann L. and Bohn, T. 2017. Negative effects of divalent mineral cations on the bioaccessibility of carotenoids from plant food matrices and related physical properties of gastro-intestinal fluids. *Food & Function*. 8(3): 1008-1019.
- Corte-Real, J., Desmarchelier, C., Borel, P., Richling, E., Hoffmann, L. and Bohn, T. 2018. Magnesium affects spinach carotenoid bioaccessibility *in vitro* depending on intestinal bile and pancreatic enzyme concentrations. *Food Chemistry*. 239: 751-759.
- da Costa, G.A. and Mercadante, A.Z. 2018. *In vitro* bioaccessibility of free and esterified carotenoids in cajá frozen pulp-based beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*. 68: 53-59.
- De Andrade Lima, M., Charalampopoulos, D. and Chatzifragkou, A. 2018. Optimisation and modelling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction process of carotenoids from carrot peels. *The Journal of supercritical fluids*. 133: 94-102.
- de la Fuente, B., López-García, G., Mániz, V., Alegría, A., Barberá, R. and Cilla, A. 2019. Evaluation of the bioaccessibility of antioxidant bioactive compounds and minerals of four genotypes of Brassicaceae microgreens. *Foods*. 8(7): 250.
- de Oliveira, C.L., Brychkova, G., Esteves-Ferreira, A.A., McKeown, P., de Souza Gomes, M., Maluf, W.R., Augusto-Gomez L.A. and Spillane, C. 2020. Thermal disruption of the food matrix of biofortified lettuce varieties modifies absorption of carotenoids by Caco-2 cells. *Food Chemistry*: 308: 125443.
- de Munter, L., Maasland, D.H., van den Brandt, P.A., Kremer, B. and Schouten, L.J. 2015. Vitamin and carotenoid intake and risk of head-neck cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 102(2): 420-432.
- Dhliwayo, T., Palacios-Rojas, N., Crossa, J. and Pixley, K.V. 2014. Effects of S<sub>1</sub> recurrent selection for provitamin A carotenoid content for three open-pollinated maize cultivars. *Crop Science*. 54(6): 2449-2460.
- Desmarchelier, C. and Borel, P. 2017. Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends in Food Science & Technology*. 69(Part B): 270-280.
- de Souza Mesquita, L.M., Neves, B.V., Pisani, L.P. and de Rosso, V.V. 2020. Mayonnaise as a model food for improving the bioaccessibility of carotenoids from *Bactris gasipaes* fruits. *LWT*. 122: 109022.
- Dhuique-Mayer, C., Servent, A., Messan, C., Achir, N., Dornier, M. and Mendoza, Y. 2018. Bioaccessibility of biofortified sweet potato carotenoids in baby food: impact of manufacturing process. *Frontiers in Nutrition*: 5: 98.
- Diamante, M.S., Borges, C.V., Minatel, I.O., Jacomino, A.P., Basílio, L.S.P., Monteiro, G.C., Correa C.R., de Oliveira R.A. and Lima, G.P.P. 2021. Domestic cooking practices influence the carotenoid and tocopherol content in colored cauliflower. *Food Chemistry*. 340: 127901.
- Donado-Pestana, C.M., Salgado, J.M., de Oliveira Rios, A., dos Santos, P.R. and Jablonski, A. 2012. Stability of carotenoids, total phenolics and *in vitro* antioxidant capacity in the thermal processing of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) cultivars grown in Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*. 67(3): 262-270.
- Elizondo-Montemayor, L., Ramos-Parra, P.A., Jacobo-Velázquez, D.A., Treviño-Saldaña, N., Marín-Obispo, L.M., Ibarra-Garza, I.P., García-Amezquita, L.E., del Follo-Martínez, A., Welti-Chanes, J. and Hernández-Brenes, C. 2020. High hydrostatic pressure stabilized micronutrients and shifted dietary fibers, from insoluble to soluble, producing a low-glycemic index mango pulp. *CyTA-Journal of Food*. 18(1): 203-215.
- Eriksen, J.N., Luu, A.Y., Dragsted, L.O. and Arrigoni, E. 2017. Adaption of an *in vitro* digestion method to screen carotenoid liberation and *in vitro* accessibility from differently processed spinach preparations. *Food Chemistry*. 224: 407-413.
- Etzbach, L., Stolle, R., Anheuser, K., Herdegen, V., Schieber, A. and Weber, F. 2020. Impact of different pasteurization techniques and subsequent ultrasonication on the *in vitro* bioaccessibility of carotenoids in Valencia Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice. *Antioxidants*. 9(6): 534.
- Feroli, F., Giambanelli, E., D'Antuono, L. F., Costa, H.S., Albuquerque, T.G., Silva, A.S., Hayran, O. and Koçaoglu, B. 2013. Comparison of leafy kale populations from Italy, Portugal, and Turkey for their bioactive compound content: phenolics, glucosinolates, carotenoids, and chlorophylls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(14): 3478-3489.
- Fernandez-Orozco, R., Gallardo-Guerrero, L. and Hornero-Méndez, D. 2013. Carotenoid profiling in tubers of different potato (*Solanum* sp) cultivars: Accumulation of carotenoids mediated by xanthophyll esterification. *Food Chemistry*. 141(3): 2864-2872.
- Fратиanni, A., Adiletta, G., Di Matteo, M., Panfili, G., Niro, S., Gentile, C., Farina, V., Cinquanta, L. and Corona, O. 2020. Evolution of carotenoid content, antioxidant activity and volatiles compounds in dried mango fruits (*Mangifera indica* L.). *Foods*. 9(10): 1424.
- García-Cayuela, T., Nuño-Escobar, B., Welti-Chanes, J. and Cano, M.P. 2018. *In vitro* bioaccessibility of individual carotenoids from persimmon (*Diospyros kaki*, cv. Rojo Brillante) used as an ingredient in a model dairy food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98(9): 3246-3254.
- García-Romera, M.C., Silva-Viguera, M.C., López-Izquierdo, I., López- Muñoz, A., Capote-Puente, R. and Gargallo-Martínez, B. 2022. Effect of macular pigment carotenoids on cognitive functions: A systematic review. *Physiology & Behavior*. 254: 113891.



- Goltz, S.R., Campbell, W.W., Chitchumroonchokchai, C., Failla, M.L. and Ferruzzi, M.G. 2012. Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. 56(6): 866-877.
- González-Casado, S., Martín-Belloso, O., Elez-Martínez, P. and Soliva-Fortuny, R. 2018. Application of pulsed electric fields to tomato fruit for enhancing the bioaccessibility of carotenoids in derived products. *Food & Function*. 9(4): 2282-2289.
- Hayes, M., Pottorff, M., Kay, C., Van Deynze, A., Osorio-Marin, J., Lila, M. A., Iorizzo M. and Ferruzzi, M.G. 2020. In vitro bioaccessibility of carotenoids and chlorophylls in a diverse collection of spinach accessions and commercial cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68(11): 3495-3505.
- Hempel, J., Schädle, C.N., Sprenger, J., Heller, A., Carle, R. and Schweiggert, R.M. 2017. Ultrastructural deposition forms and bioaccessibility of carotenoids and carotenoid esters from goji berries (*Lycium barbarum* L.). *Food Chemistry*. 218: 525-533.
- Hu, K., Peng, D., Wang, L., Liu, H., Xie, B. and Sun, Z. 2021. Effect of mild high hydrostatic pressure treatments on physiological and physicochemical characteristics and carotenoid biosynthesis in postharvest mango. *Postharvest Biology and Technology*. 172: 111381.
- Iddir, M., Porras Yaruro, J.F., Cocco, E., Hardy, E.M., Appenzeller, B.M., Guignard, C., Larondelle Y. and Bohn, T. 2021. Impact of protein-enriched plant food items on the bioaccessibility and cellular uptake of carotenoids. *Antioxidants*. 10(7): 1005.
- Iskandar, A.R., Miao, B., Li, X., Hu, K.Q., Liu, C. and Wang, X.D. 2016.  $\beta$ -cryptoxanthin reduced lung tumor multiplicity and inhibited lung cancer cell motility by downregulating nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  signaling. *Cancer Prevention Research*. 9(11): 875-886.
- Jacobo-Velázquez, D.A. and Hernández-Brenes, C. 2012. Stability of avocado paste carotenoids as affected by high hydrostatic pressure processing and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 16: 121-128.
- Jeffery, J.L., Turner, N.D. and King, S.R. 2012. Carotenoid bioaccessibility from nine raw carotenoid-storing fruits and vegetables using an *in vitro* model. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(13): 2603-2610.
- Karppi, J., Kurl, S., Mäkikallio, T.H., Ronkainen, K. and Laukkanen, J.A. 2013. Serum  $\beta$ -carotene concentrations and the risk of congestive heart failure in men: a population-based study. *International Journal of Cardiology*. 168(3): 1841-1846.
- Kim, J.H., Lee, J., Choi, I.J., Kim, Y.I., Kwon, O., Kim, H. and Kim, J. 2018. Dietary carotenoids intake and the risk of gastric cancer: A case—control study in Korea. *Nutrients*. 10(8): 1031.
- Kljak, K. and Grbeša, D. 2015. Carotenoid content and antioxidant activity of hexane extracts from selected Croatian corn hybrids. *Food Chemistry*. 167: 402-408.
- Kopec, R.E. and Failla, M.L. 2018. Recent advances in the bioaccessibility and bioavailability of carotenoids and effects of other dietary lipophiles. *Journal of Food Composition and Analysis*. 68: 16-30.
- Kourouma, V., Mu, T.H., Zhang, M. and Sun, H.N. 2019. Effects of cooking process on carotenoids and antioxidant activity of orange-fleshed sweet potato. *Lwt*. 104: 134-141.
- Kulczyński, B., Gramza-Michałowska, A., Kobus-Cisowska, J. and Kmiecik, D. 2017. The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge. *Journal of Functional Foods*. 38(Part A): 45-65.
- Lara-Abia, S., Welte-Chanes, J. and Cano, M.P. 2021. Effect of high hydrostatic pressure on the extractability and bioaccessibility of carotenoids and their esters from papaya (*Carica papaya* L.) and its impact on tissue microstructure. *Foods*. 10(10): 2435.
- Laurora, A., Bingham, J.P., Poojary, M.M., Wall, M.M. and Ho, K.K. 2021. Carotenoid composition and bioaccessibility of papaya cultivars from Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*. 101: 103984.
- Lebaka, V. R., Wee, Y. J., Ye, W. and Korivi, M. 2021. Nutritional composition and bioactive compounds in three different parts of mango fruit. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(2): 741.
- Leong, S. Y. and Oey, I. 2012. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 133(4): 1577-1587.
- Li, Q., Li, T., Liu, C., Chen, J., Zhang, R., Zhang, Z., Dai T. and McClements, D.J. 2016. Potential physicochemical basis of Mediterranean diet effect: Ability of emulsified olive oil to increase carotenoid bioaccessibility in raw and cooked tomatoes. *Food Research International*. 89: 320-329.
- Liang, M., Su, X., Yang, Z., Deng, H., Yang, Z., Liang, R. and Huang, J. 2020. Carotenoid composition and expression of carotenogenic genes in the peel and pulp of commercial mango fruit cultivars. *Scientia Horticulturae*. 263: 109072.
- López-Gámez, G., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. and Soliva-Fortuny, R. 2021. Pulsed electric field treatment strategies to increase bioaccessibility of phenolic and carotenoid compounds in oil-added carrot purees. *Food Chemistry*. 364: 130377.
- Lu, M.S., Fang, Y.J., Chen, Y.M., Luo, W.P., Pan, Z.Z., Zhong, X. and Zhang, C.X. 2015. Higher intake of carotenoid is associated with a lower risk of colorectal cancer in Chinese adults: a case–control study. *European Journal of Nutrition*, 54(4): 619-628.
- Ma, T., Tian, C., Luo, J., Sun, X., Quan, M., Zheng, C. and Zhan, J. 2015. Influence of technical processing units on the  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and lutein contents of carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Journal of Functional Foods*. 16: 104-113.
- Mapelli-Brahm, P., Stinco, C.M., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. and Meléndez-Martínez, A.J. 2018. Impact of thermal treatments on the bioaccessibility of phytoene and phytofluene in relation to changes in the microstructure and size of orange juice particles. *Journal of Functional Foods*. 46: 38-47.
- Matsumoto, M., Waki, N., Sukanuma, H., Takahashi, I., Kurauchi, S., Sawada, K., Tokuda, I., Misawa, M., Ando, M., Itoh, K. and Ihara, K. 2020. Association between biomarkers of cardiovascular diseases and the blood concentration of carotenoids among the general population without apparent illness. *Nutrients*. 12(8): 2310.
- Meléndez-Martínez, A.J., Pérez-Gálvez, A., Roca, M., Estévez-Santiago, R., Olmedilla-Alonso, B., Mercadante, A.Z. and Ornelas-Paz, J.J. 2017. Bioavailability of carotenoids, determining factors and estimation methods (in Spanish). En: *Carotenoides en agroalimentación y salud*. Meléndez-Martínez A.J. (ed.), pp 574-608. Editorial Terracota S.A. de C.V., México.



- Mercado-Mercado, G., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.A., Alvarez-Parrilla, E. and Sáyago-Ayerdi, S.G. 2018. Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from mango (*Mangifera indica* L. Ataulfo) by-products on in vitro bioaccessibility. *Food Bioscience*. 21: 125-131.
- Ordóñez-Santos, L.E., Martínez-Girón, J. and Arias-Jaramillo, M.E. 2017. Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in Cape gooseberry juice. *Food Chemistry*. 233: 96-100.
- Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M. and Gardea-Béjar, A.A. 2010. Bioconversion efficiency of  $\beta$ -carotene from mango fruit and carrots in vitamin A. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 5(3): 301-308.
- Ornelas-Paz, J.J. and Yahia, E.M. 2014. Effect of the moisture content of forced hot air on the postharvest quality and bioactive compounds of mango fruit (*Mangifera indica* L. Cv. Manila). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(6): 1078-1083.
- Ornelas-Paz, J.J., Meza, M.B., Obenland, D., Friscia, K.R., Jain, A., Thornton, S. and Prakash, A. 2017. Effect of phytosanitary irradiation on the postharvest quality of Seedless Kishu mandarins (*Citrus kinokuni mukakukishu*). *Food Chemistry*. 230: 712-720.
- Ranganath, K.G., Shivashankara, K.S., Roy, T.K., Dinesh, M.R., Geetha, G.A., Pavithra, K.C. and Ravishankar, K.V. 2018. Profiling of anthocyanins and carotenoids in fruit peel of different colored mango cultivars. *Journal of Food Science and Technology*. 55(11): 4566-4577.
- Reboul, E. 2013. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients*. 5(9): 3563-3581.
- Reif, C., Arrigoni, E., Berger, F., Baumgartner, D. and Nyström, L. 2013. Lutein and  $\beta$ -carotene content of green leafy *Brassica* species grown under different conditions. *LWT-Food Science and Technology*. 53(1): 378-381.
- Rock, C.L. and Swendseid, M.E. 1992. Plasma  $\beta$ -carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 55(1): 96-99.
- Rowles, J.L. and Erdman, J.W. 2020. Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1865: 158613.
- Samuolienė, G., Brazaitytė, A., Sirtautas, R., Viršilė, A., Sakalauskaitė, J., Sakalauskienė, S. and Duchovskis, P. 2013. LED illumination affects bioactive compounds in romaine baby leaf lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(13): 3286-3291.
- Schweiggert, R.M., Mezger, D., Schimpf, F., Steingass, C.B. and Carle, R. 2012. Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato. *Food Chemistry*. 135(4): 2736-2742.
- Schweiggert, R.M. and Carle, R. 2017. Carotenoid deposition in plant and animal foods and its impact on bioavailability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(9): 1807-1830.
- Sluijs, I., Cadier, E., Beulens, J.W.J., Spijkerman, A.M.W. and Van der Schouw, Y.T. 2015. Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 25(4): 376-381.
- Suo, G., Zhou, C., Su, W. and Hu, X. 2022. Effects of ultrasonic treatment on color, carotenoid content, enzyme activity, rheological properties, and microstructure of pumpkin juice during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*. 84: 105974.
- Swapnil, P., Meena, M., Singh, S.K., Dhuldhaj, U.P., Harish. and Marwal, A. 2021. Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Current Plant Biology*. 26:100203.
- Szczepańska, J., Skąpska, S., Połaska, M. and Marszałek, K. 2022. High pressure homogenization with a cooling circulating system: The effect on physicochemical and rheological properties, enzymes, and carotenoid profile of carrot juice. *Food Chemistry*. 370: 131023.
- Van Hoang, D., Pham, N.M., Lee, A.H., Tran, D.N. and Binns, C.W. 2018. Dietary carotenoid intakes and prostate cancer risk: A case-control study from Vietnam. *Nutrients*. 10(1): 70.
- Viacava, F., Ramos-Parra, P.A., Welti-Chanes, J. and Jacobo-Velázquez, D.A. 2021. High hydrostatic pressure processing of whole carrots: Effect of static and multi-pulsed mild intensity hydrostatic pressure treatments on bioactive compounds. *Foods*. 10(2): 219.
- Victoria-Campos, C.I., Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M., Jiménez-Castro, J.A., Cervantes-Paz, B., Ibarra-Junquera, V., Pérez-Martínez, J.D., Zamudio-Flores, P.B. and Escalante-Minakata, P. 2013. Effect of ripening, heat-processing, and fat type on the micellization of pigments from jalapeño peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(41): 9938-9949.
- Wang, Y., Chung, S.J., McCullough, M.L., Song, W.O., Fernandez, M.L., Koo, S.I. and Chun, O.K. 2014. Dietary carotenoids are associated with cardiovascular disease risk biomarkers mediated by serum carotenoid concentrations. *The Journal of Nutrition*. 144(7): 1067-1074.
- Yahia, E. M., Ornelas-Paz, J. J., Emanuelli, T., Jacob-Lopes, E., Queiroz-Zepka, L. and Cervantes-Paz, B. 2018. Chemistry, stability and biological actions of carotenoids. En: *Fruit and vegetable phytochemicals*. Yahia, E.M. (ed.), pp 285-345. Blackwell Publishing, England.
- Yuan, C., Chen, H., Wang, Y., Schneider, J.A., Willett, W.C. and Morris, M.C. 2021. Dietary carotenoids related to risk of incident Alzheimer dementia (AD) and brain AD neuropathology: a community-based cohort of older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 113(1): 200-208.
- Zhang, Z., Wei, Q., Nie, M., Jiang, N., Liu, C., Liu, C., Li, D. and Xu, L. 2018. Microstructure and bioaccessibility of different carotenoid species as affected by hot air drying: Study on carrot, sweet potato, yellow bell pepper and broccoli. *LWT*. 96: 357-363.
- Zhang, W., Yu, Y., Xie, F., Gu, X., Wu, J. and Wang, Z. 2019. High pressure homogenization versus ultrasound treatment of tomato juice: Effects on stability and in vitro bioaccessibility of carotenoids. *LWT*. 116: 108597.
- Zhao, J.J., Wang, J.B., Zhang, X.C., Li, H.L. and Gao, Z.Y. 2013. Effect of bagging on the composition of carbohydrate, organic acid and carotenoid contents in mango fruit. *Acta Horticulturae*. 992: 537-542.
- Zhong, S., Vendrell-Pacheco, M., Heskitt, B., Chitchumroonchokchai, C., Failla, M., Sastry, S.K., Francis, D.M., Martínez-Belloso, O., Elez-Martínez, P. and Kopec, R.E. 2019. Novel processing technologies as compared to

thermal treatment on the bioaccessibility and Caco-2 cell uptake of carotenoids from tomato and kale-based juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67(36): 10185-10194.

Zhou, W., Niu, Y., Ding, X., Zhao, S., Li, Y., Fan, G., Zhang, S. and Liao, K. 2020. Analysis of carotenoid content and diversity in apricots (*Prunus armeniaca* L.) grown in China. *Food Chemistry*. 330: 127223.

## Evaluation of antimicrobial susceptibility and genetic profiles (ERIC-PCR) of *Enterococcus* species isolated from chicken viscera

Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos y perfiles genéticos (ERIC-PCR) de especies *Enterococcus* aislados de vísceras de pollo

Arantxa Almada-Corral<sup>1</sup>, Maritza Alejandra Cordero-Ortiz<sup>1</sup>, Lizbeth Dolores Ballesteros-Herrera<sup>1</sup>, Siria de Jesús Calderón-Montoya<sup>1</sup>, Enrique Bolado-Martínez<sup>1</sup>, Reyna Isabel Sánchez-Mariñez<sup>1</sup>, Alfonso García-Galaz<sup>2</sup>, Iracema del Carmen Rodríguez-Hernández<sup>1</sup>, Mario Onofre Cortez-Rocha<sup>3</sup> and Maritza Lizeth Álvarez-Ainza<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Microbiology, Department of Chemical and Biological Sciences, University of Sonora. Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico.

<sup>2</sup> Coordination of Food Science. Research Center in Food and Development A.C., Carretera a la Victoria Km 0.6, P.O. Box 1735, Hermosillo, Sonora, Mexico.

<sup>3</sup> Laboratory of Microbiology, Department of Food Research and Graduate Program, University of Sonora. Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico.

### ABSTRACT

The genus *Enterococcus* can be found in water, soil, and food, and above all, they are part of the animal (including human) intestinal microbiota. Food prevalence is mainly due to their resistance to adverse environmental conditions. Seventy-three isolates from chicken viscera were confirmed to belong to the *Enterococcus* genus by biochemical tests and carbohydrate fermentation. Phenotypic characterization of the species indicates that *E. casseliflavus* was the predominant specie. Antimicrobial resistance to amikacin (42 %), kanamycin (38 %), streptomycin (55 %) and erythromycin (33 %) in the isolates was notorious. The analysis obtained from ERIC-PCR profiles shows a high genetic variability among the isolates. In addition, a relationship between the antimicrobial and ERIC-PCR profiles was observed among isolates. These results indicate the presence of multi-resistant *Enterococcus* in commercial chicken viscera with high genetic variability, which could be a potential nosocomial bacterium or transfer this resistance to another pathogenic species causing human diseases.

**Keywords:** *Enterococcus*; antimicrobials; identification; resistance; food safety.

### RESUMEN

El género *Enterococcus* puede ser encontrado en agua, suelo y en general en todo ambiente, son parte de la microbiota intestinal de animales, incluyendo a humanos. La prevalencia en alimentos se debe principalmente a la resistencia que presentan a las condiciones adversas del ambiente. Setenta y tres aislados de vísceras de pollo fueron confirmados como pertenecientes al género a través de pruebas bioquímicas y fermentación de carbohidratos. La caracterización bioquímica indicó que la especie predominante fue *E. casseliflavus*. La resistencia de los aislados a antimicrobianos fue notoria para amikacina (42 %), kanamicina (38 %), estreptomycin (55 %), y eritromicina (33 %). El análisis obtenido por ERIC-PCR mostró una alta variabilidad genética entre los aislados. Así también,

los aislados mostraron relación entre los perfiles obtenidos con la susceptibilidad a antimicrobianos y por ERIC-PCR. Estos resultados muestran la multi-resistencia de *Enterococcus* en vísceras de pollo expedidos comercialmente, con una alta variabilidad genética. Además, estos *Enterococcus* pueden ser potencialmente patógenos en individuos como una bacteria nosocomial y además transferir la resistencia en especies que son estrictamente patógenas y causan enfermedades al humano.

**Palabras clave:** *Enterococcus*; antimicrobianos; identificación; resistencia; seguridad alimentaria.

### INTRODUCTION

*Enterococcus* genus are Gram-positive cocci, generally grouped in pairs or short chains. They are facultative anaerobes, catalase-negative, and have Lancefield group D oligosaccharides. Their primary habitat is water, soil, and food; above all, they are part of animal (including) intestinal microbiota (Ortega-González, 2010). The *Enterococcus* genus include species associated with human diseases whose prevalence in food is mainly due to their resistance to adverse environmental conditions (Marguet *et al.*, 2008; Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2017). *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* are the two main species involved in human infections such as bacteremia, infective endocarditis, wound infections, and urinary tract infections, among others (Alzahrani *et al.*, 2022; Hammerum 2012; Hayes *et al.*, 2004), and they are resistant to antimicrobials. *Enterococcus* is inherently resistant to several first-line antimicrobial agents; they show low-level resistance to  $\beta$ -lactams and aminoglycosides (Alzahrani *et al.*, 2022). Therefore, controlling bacterium infections and avoiding cross-contamination with food is of utmost importance (Hammerum, 2012).

Since the detection of vancomycin-resistant *Enterococcus* and streptogramin-resistant *E. faecium* outside hospitals, molecular typing methods have been implemented to compare enterococci from different sources. The genetic

\*Autor para correspondencia: Maritza Lizeth Álvarez Ainza  
 Correo electrónico: maritza.alvarez@unison.mx

Recibido: 10 de octubre de 2022

Aceptado: 9 de noviembre de 2022

profiles obtained gave a clearer picture of the isolates involved and a comparison of the clonal transfer of plasmids (Hammerum, 2012).

Molecular techniques are preferable to phenotypic ones due to their better reproducibility, typing power, versatility, and discrimination. They are widely used as a complement to conventional epidemiological investigations, for the study of nosocomial infections of bacterial etiology as well as in the epidemiological study of different bacterial isolates distribution, based on genetic profiles (Corrales and López-Cánovas, 2016). One of the molecular techniques proven useful to precisely distinguish between *E. faecalis* and *E. hirae* isolates, and to reveal the genetic diversity of *E. faecalis* isolates from birds is the amplification of intergenic repetitive consensus sequences (ERIC-PCR). In addition, it has shown great discriminating power between cheese *E. faecium* isolates, compared to other techniques such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Therefore, it is useful to obtain a bacterial genetic distribution and epidemiology (Blanco *et al.*, 2017). Also, in other studies, ERIC-PCR has shown a good differentiation power for *E. coli* molecular typing (Ardakani and Ranjbar, 2016; Ramakrishnan *et al.*, 2022).

Thus, the aim of this study was to determine the antibiotic susceptibility and the genetic profiles using ERIC-PCR of *Enterococcus* spp. previously isolated from commercial chicken viscera in order to observe the relationship of these isolates.

## MATERIALS AND METHODS

### Strain reactivation

*Enterococcus* samples isolated from chicken viscera purchased in retail stores from Hermosillo, Sonora, México, were conserved by deep freezing (-80 °C). Vials were defrosted at 25 °C, placed into BHI broth, and incubated at 36 °C for 24 - 48 h for reactivation. Initially, every chicken viscera was evaluated according to the Official Mexican Norm NOM-210-SSA1-2014 (DOF, 2015) at the University of Sonora Microbiology laboratory, for the obtention of *Enterococcus*. All the positive and confirmed *Enterococcus* isolates were used in this study.

### Phenotypic characterization

Biochemical tests were performed on the previous isolates to observe the typical characteristics of the genus *Enterococcus*. The tests carried out were Gram staining, catalase, growth in salty BHI broth, and Bile Esculin Medium (BEM) (Devriese *et al.*, 1993). Also, the carbohydrate fermentation test was carried out according to the recommendations of García-Galaz *et al.* (2004). Sorbose, lactose, adonitol, melibiose, raffinose, arabinose, glucose, galactose, sorbitol, sucrose, trehalose, inulin, xylose and mannitol were used.

### Antimicrobial resistance determination

The disk diffusion method was used according to the recommendation of the Clinical & Laboratory Standards

Institute (CLSI, 2020) to evaluate the isolates resistance to the following antimicrobials: ampicillin (10 µg), streptomycin (10 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), kanamycin (30 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20 +10 µg), erythromycin (15 µg), ciprofloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg), nitrofurantoin (100 µg), imipenem (10 µg), tetracycline (30 µg) and vancomycin (30 µg). *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212) and *E. faecalis* (ATCC 51299) were used as control strains. The assay was performed in Mueller-Hinton Agar (Difco), and the inoculum of each bacterium was obtained by the absorbance 665 nm (0.08 - 01) using a spectrometer (Thermo Spectronic 40001/4).

### Genomic characterization by ERIC-PCR

**DNA extraction.** Once the isolates were phenotypically characterized, their genomic DNA was extracted according to Wright *et al.* (2017) with some modifications using lysozyme (24000 kU/mL, Sigma, Canada) and mutanolysin (40 kU/mL). The DNA integrity was checked through a 1.0 % agarose gel electrophoresis and developed with GelRed (Biotum, U.S.A.) under ultraviolet light. Subsequently, the bacterial genetic material was quantified using an AquaMate Vis spectrophotometer (Thermo Scientific).

**ERIC-PCR.** Amplification of the DNA extracted from each isolate was carried out by the ERIC-PCR technique. The reaction mixture contained 200 µM of dNTP's, 0.4 µM of ERIC- 1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'), 0.4 µM ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG- 3'), 2 mM of MgCl<sub>2</sub> (Promega, USA), 5 µL of 5X buffer with dye (Promega, USA), and one U of Taq DNA polymerase (Promega, USA). Then, sterile deionized water was added to complete a final volume of 20 µL and gently homogenized. Finally, 5 µL of previously extracted DNA (containing 100 ng) were added to each microtube with the reaction mixture (Modified from Cabral *et al.*, 2012; Durmaz *et al.*, 2015). After obtaining the ERIC-PCR results, the profiles were visualized or checked through a 1.5 % agarose gel electrophoresis and developed with GelRed (Biotum, U.S.A.) under ultraviolet light, and the image captured by the photodocumentator WiseDOc (WGD-305, Korea). The fragments size was estimated and compared with the 100-bp molecular ladder.

### Statistical analysis

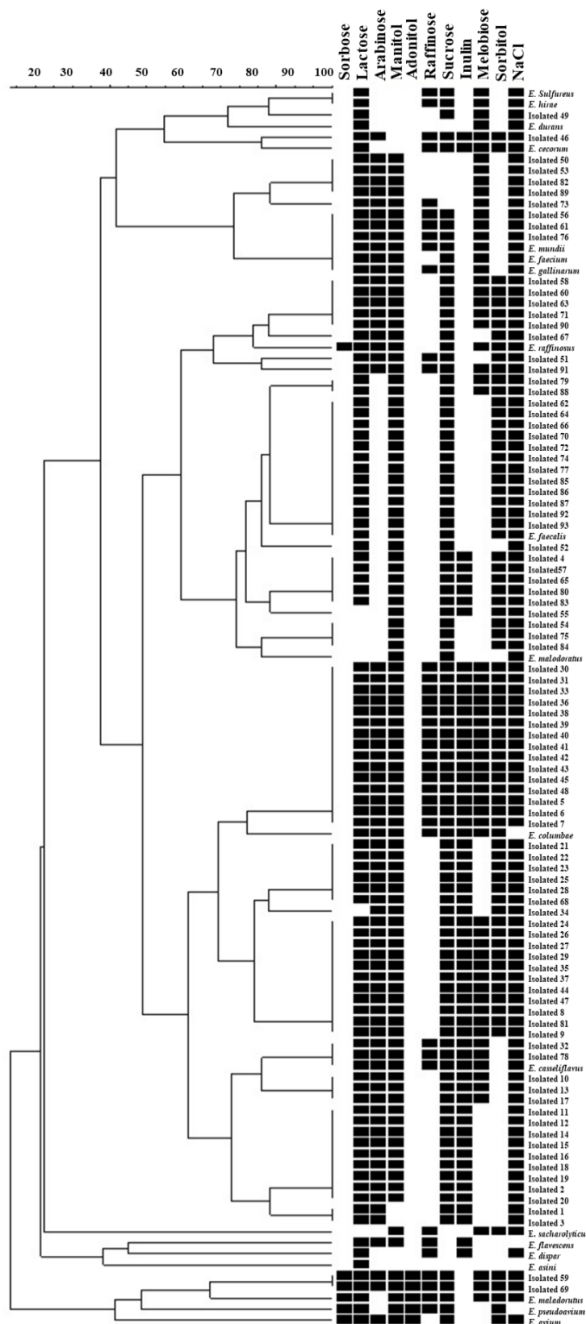
The results of the carbohydrate fermentation test and the ERIC-PCR profiles were analyzed with the BioNumerics version 6.5 software (Applied Maths, Belgium), using Pearson or UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) to make the clusters and the DICE coefficient (80 %), which provides a percentage of similarity among the *Enterococcus* isolates. Furthermore, the ERIC-PCR results were correlated with the determination of antibiotic resistance through the disk diffusion test (Durmaz *et al.*, 2015).

## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 73 isolates were confirmed to belong to the *Enterococcus* genus. The carbohydrate fermentation results



gave the presumptive phenotypic characterization of the species, and by means of the BioNumerics program output, it was possible to form isolates groups, a dendrogram (Figure 1). It allowed us to relate and discriminate the species with more than 60 % similarity. According to the prevalence (%) for each *Enterococcus* species, *E. casseliflavus* and *E. faecalis* showed the highest prevalence, corresponding to 53 % (39 isolates) and 20.5 % (15 isolates), respectively. The rest of the species showed lower than or equal to 6 %, as shown in Table 1.



**Figure 1.** Dendrogram of *Enterococcus* species isolated from chicken viscera, according to their biochemical characteristics.  
**Figure 1.** Dendrograma de las especies de *Enterococcus* aisladas de vísceras de pollo, de acuerdo con sus características bioquímicas.

**Table 1.** *Enterococcus* species isolated from chicken viscera identified by biochemical characteristics.

**Tabla 1.** Especies de *Enterococcus* aisladas de vísceras de pollo, de acuerdo con sus características bioquímicas.

Identified species	Total isolated	% Isolated
<i>E. casseliflavus</i>	49	53 %
<i>E. faecalis</i>	21	23 %
<i>E. raffinosus</i>	8	9 %
<i>E. faecium</i>	5	5 %
<i>E. solitarius</i>	3	3 %
<i>E. mundtii</i>	3	3 %
<i>E. malodoratus</i>	2	2 %
<i>E. cecorum</i>	1	1 %
<i>E. durans</i>	1	1 %
Total	73	100 %

In chickens, it has been observed that an age-dependent succession of enterococcal species colonizes the intestines. Initially, they are colonized by *E. faecalis*, then displaced mainly by *E. faecium*, and afterwards, these species are replaced by *E. cecorum* in adult chickens (Aarestrup *et al.*, 2002; Lebreton *et al.*, 2014). Nevertheless, Lebreton *et al.* (2014) indicate that *E. faecalis* is also found in young chickens. For this reason, the *E. faecalis* species found in our study could be due to human contamination during handling the product since they were not young chickens.

Our results differ from those reported by Hidano *et al.* (2015) and Alzahrani *et al.* (2022), who isolated *Enterococcus* species from chicken product samples. They found that *E. faecalis* (75 and 50 %) dominated as the high-prevalence species followed by *E. faecium* (16 and 33 %). This contrasts with our results since *E. faecalis* appeared with high frequency, whereas *E. faecium* had a prevalence near 5 %.

On the other hand, *E. cecorum* was initially described as part of the normal microbiota in poultry, which coincides with the findings in this work. Even if it was found in low proportion, it is recognized as an important pathogen in feedlots. In the case of humans, it has had sporadic participation in infections such as septicemia, endocarditis and osteomyelitis (Hayes *et al.*, 2004).

Gallegos and Guerrero (2004) performed a similar study in which *Enterococcus* was isolated from chicken viscera. They found that 23 % of isolates belonged to *E. casseliflavus*, also reporting *E. cecorum* (22.8 %), *E. gallinarum* (19.4 %), *E. sulfureus* (10.1 %), *Enterococcus spp.* (8.4 %), *E. avium* (6.7 %), *E. malodoratus* (5.9 %), *E. faecalis* (1.6 %) and *E. hirae* (0.8 %). These results partially agree with the data obtained in our study. The diversity of species is similar, *E. casseliflavus* was predominated in both cases, but there is dissimilarity in the other species prevalence, which might be due to the raising poultry practices, that can modify the *Enterococci* species in the microbiota.

### Resistance to Antibiotics by Disk Diffusion

Results of the resistance profiles determined by the disk diffusion test are presented in Table 2. The antimicrobial resistance demonstrated by all the isolates to antibiotics was notorious for amikacin (42 % of the isolates), kanamycin (38 %), streptomycin (55 %) in addition to erythromycin (33 %). These results indicate that the susceptibility to the antimicrobials is low and a large number of the isolated showed intermediate susceptibility. Also, it is noteworthy the representative number of isolated resistance to vancomycin (22 %), which is interesting since these isolates were obtained from chicken viscera, not from a hospital source, where phenotypes with resistance to this antibiotic are commonly found. The results in this work are similar to those reported by Alzahrani *et al.* (2022), where resistance to tetracycline (55.6 %), erythromycin (31.1 %), ciprofloxacin (21.1 %) ampicillin (30 %) and nitrofurantoin (17.8 %) were the most frequent, except the last two antibiotics which in our work, showed low resistance. In theory, the chicken viscera isolated have not been exposed to antibiotics. However, it is possible that the human handling of the product in the supermarket was the contamination source.

Moreover, it is acknowledged that different types of antibiotics are used in poultry raising, mainly those that belong to macrolides (erythromycin), trimethoprim, fluoroquinolones and tetracyclines, either in a therapeutic or sub-therapeutic way. For this reason, the resistance shown may be due to the chicken viscera samples obtained. Poultry may have been exposed to antibiotics belonging to any of these groups. However, it should be noted that enterococci have intrinsic resistance to macrolides (Novais *et al.*, 2013; Daniel *et al.*, 2015; Woolhouse *et al.*, 2015).

The results of the disk diffusion test shows that the isolates are multidrug-resistant. However, one isolate showed resistance to eight antibiotics and was characterized as *Enterococcus faecium*. Its high percentage of resistance to vancomycin is worrisome because it is a naturally multi-resistant bacterium, in which daptomycin and linezolid resistance also begins to appear. In some cases, this has led to a total absence of effective antibiotics (Alós, 2015).

The multidrug resistance among *Enterococcus* species may be due to their intrinsic resistance to aminoglycosides and  $\beta$ -lactams, or because they can easily acquire resistance from the environment where extrinsic resistance is found.

**Table 2.** *Enterococcus* spp. susceptibility to antibiotics analyzed by the disc diffusion method.

**Table 2.** Susceptibilidad a antibióticos en *Enterococcus* spp. analizados a través del método de disco difusión.

Drug group	Antibiotic	% Resistant (n)	% Intermediate (n)	% Susceptible (n)
1. Aminoglycosides	AMK	42 % (31)	14 % (10)	44 % (32)
	KAN	38 % (28)	35 % (26)	26 % (19)
	STR	55 % (40)	20 % (15)	25 % (18)
2. Aminopenicillins	AMC	8 % (6)	0 % (0)	92 % (67)
	AMP	2 % (3)	1 % (1)	96 % (70)
3. Carbapenems	IMP	3 % (2)	0 % (0)	97 % (71)
4. Fluoroquinolones	CIP	18 % (17)	27 % (20)	55 % (40)
	NOR	14 % (10)	9 % (7)	77 % (56)
5. Glycopeptides	VAN	22 % (16)	21 % (15)	57 % (42)
6. Macrolides	ERI	33 % (24)	38 % (38)	15 % (11)
7. Nitrofurans	NIT	10 % (14)	9 % (7)	84 % (61)
8. Tetracyclines	TCY	22 % (16)	4 % (3)	74 % (54)

AMK: Amikacin; KAN: Kanamycin; STR: Streptomycin; AMC: Amoxicillin/clavulanic acid; AMP: Ampicillin; IMP: Imipenem; CIP: Ciprofloxacin; NOR: Norfloxacin; VAN: Vancomycin; ERI: Erythromycin; NIT: Nitrofurantoin; TCY: Tetracycline. The bacterium susceptibility (Resistant, Intermediate and Susceptible) was determined based on CLSI recommendations and the disk fabricant of each antimicrobial, using control strains.

AMK: Amikacina; KAN: Kanamicina; STR: Estreptomicina; AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: Ampicilina; IMP: Imipenem; CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacino; VAN: Vancomicina; ERI: Eritromicina; NIT: Nitrofurantoina; TCY: Tetraciclina. La susceptibilidad de las bacterias (Resistente, Intermedio y Susceptible) fue determinada basada en las recomendaciones del CLSI y las del fabricante de cada antimicrobiano, utilizando las cepas control.

Due to the massive use of antibiotics, a highly significant increase in the prevalence of resistance has been observed worldwide (Cercenado, 2011; Alós, 2015).

The appearance of MDR (Multidrug-resistant) bacteria (in this case *Enterococcus*) in livestock and poultry industry is a public health concern due to the reported transmission of these bacteria to humans. The spread of MDR bacteria occurs by consuming contaminated food, direct contact with farmers and veterinarians or indirectly by handling animal waste, contaminated soil, water, or surfaces. Resistance determinants, carried by MDR strains, can also be transmitted to other commensal isolates in the host and cause future complications. In addition, infections caused by MDR isolates have been associated with extended hospital stays, high morbidity and mortality rates (Daniel *et al.*, 2015; Price *et al.*, 2018; Beganovic *et al.*, 2018).

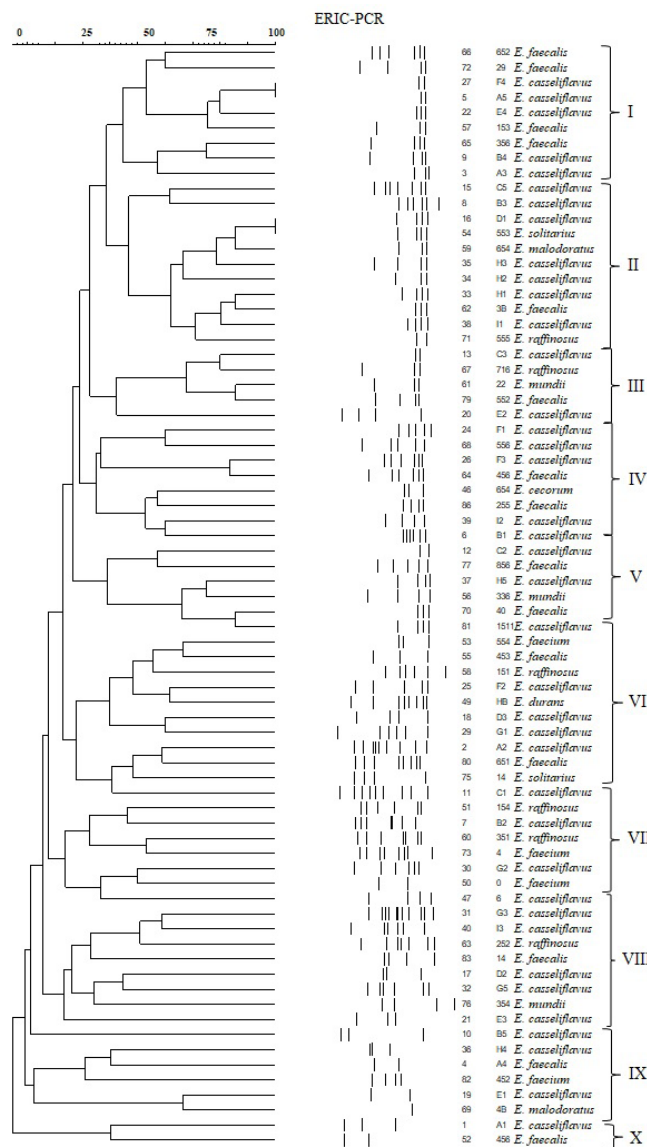
It is known that the microbiota plays a fundamental role in the regulation of the organism, and that the type of microbiota depends on various factors, including diet. Currently, selective microbiota associated with the consumption of contaminated products with resistant bacteria has been observed, which is also of great concern. Additionally, bacteria such as enterococci can easily acquire and transfer resistance. For this reason, it is essential to know the profiles of resistance and proper use of antibiotics, whether in human, veterinary, or animal husbandry medicine.

**ERIC-PCR**

All the isolates showed around 2 - 11 bands in the ERIC-PCR test. Most of them resulted in 3 (23.29 %), 4 (28.77 %), or 6 (13.70 %) bands. The ERIC segment size was 100 to 4,361 bp, coinciding with those reported by Wijetunge *et al.* (2012) who characterized *E. cecorum* species isolated from diseased poultry, and obtained between 2-7 bands with a size of 200-5000 bp, similar to those obtained in our study.

The band analysis from the ERIC-PCR products electrophoretic gels, through a dendrogram obtained by UPGMA analysis using the DICE coefficient with a similarity value of 80 %, is shown in Figure 2. As can be seen, the analysis shows a high genetic variability among the isolates, which coincides with the findings of Wijetunge *et al.* (2012) and Blanco *et al.* (2017).

Most of the clusters had around 20 and 60 % similarity in the dendrogram analysis. Based on this, they were classified into 10 groups (I to X). Group I includes two *E. casseliflavus* isolates with 100 % similarity and one group of an isolate with ≥ 80 % similarity. Group II contains two isolates with 100 % similarity (one *E. casseliflavus*, and the other *E. solitarius*), and two groups with ≥ 80 % similarity. Group III comprises two groups with ≥ 80 % similarity, each with two isolates. Groups IV and V have only one group with ≥ 80 % similarity containing two isolates each. Groups VI to X contain isolates that do not have a significant percentage of similarity, which is why they are considered different. This analysis shows the genomic diversity among the isolated *Enterococcus*, even among the specie characteristics determined by biochemical

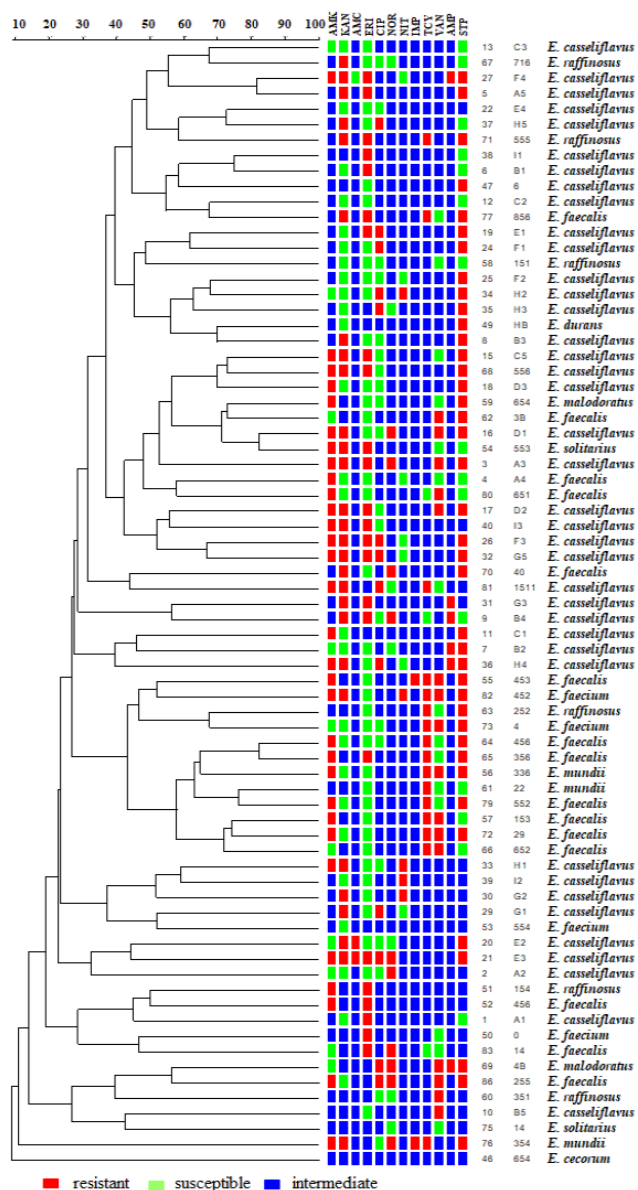


**Figure 2.** Dendrogram obtained from ERIC-PCR analysis of 73 *Enterococcus* species isolated from chicken viscera.

**Figure 2.** Dendrograma obtenido del análisis por ERIC-PCR de 73 especies de *Enterococcus* aisladas de vísceras de pollo.

tests and carbohydrate fermentation.

Figure 3 shows the dendrogram that includes the analysis of the ERIC-PCR genomic profiles and antibiotic susceptibility tests. In this analysis, the two *E. casseliflavus* isolates with 100% similarity in group I coincide in presenting resistance to kanamycin, erythromycin and streptomycin. On the other hand, they have ≥ 80 % similarity with another *E. casseliflavus* isolate, sharing resistance to kanamycin and erythromycin. In group II are two other isolates (*E. casseliflavus* and *E. solitarius*) with 100% similarity. This resistance profile coincides with amikacin, kanamycin, erythromycin, vancomycin, and streptomycin. Group III presents two similar isolates (*E. casseliflavus* and *E. raffinosus*) with resistance to kanamycin, erythromycin and streptomycin; and two other isolates (*E. mundtii* and *E. faecalis*) that have resistance to erythromycin, tetracycline, vancomycin and streptomycin.



**Figure 3.** Dendrogram obtained from the ERIC-PCR and antimicrobial profiles analysis of 73 *Enterococcus* species isolated from chicken viscera. AMK: Amikacin; KAN: Kanamycin; STR: Streptomycin; AMC: Amoxicillin/clavulanic acid; AMP: Ampicillin; IMP: Imipenem; CIP: Ciprofloxacin; NOR: Norfloxacin; VAN: Vancomycin; ERI: Erythromycin; NIT: Nitrofurantoin; TCY: Tetracycline. **Figura 3.** Dendrograma obtenido del análisis por ERIC-PCR y de perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos de 73 especies de *Enterococcus* aisladas de vísceras de pollo. AMK: Amikacina; KAN: Kanamicina; STR: Estreptomicina; AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: Ampicilina; IMP: Imipenem; CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacino; VAN: Vancomicina; ERI: Eritromicina; NIT: Nitrofurantoina; TCY: Tetraciclina.

In group IV, there are two isolates (*E. casseliflavus* and *E. faecalis*) with resistance to amikacin, kanamycin, erythromycin, ciprofloxacin and streptomycin. Group V contains two similar isolates (*E. faecalis* and *E. casseliflavus*) with resistance to kanamycin and norfloxacin.

The similarity percentage used for the dendrogram analysis was  $\geq 80\%$ . Fifteen isolates had a resistance percentage higher than or equal to 80%, showing a great diversity

of strains among the isolates, even of the same species according to the phenotypic characterization. As mentioned above, this was perhaps due to the product handling in the different supermarkets where poultry viscera were obtained. Also, the chicken samples could come from different farms and/or companies.

These results agree with those of Bedendo and Pignatari (2000), where identical profiles were observed through molecular techniques in *E. malodoratus* and *E. hirae* samples. They stated that this may indicate that conducting studies only at the phenotypic level, such as biochemical tests or susceptibility to antibiotics, does not provide accurate results about the species. Also, that among different species, it is possible to obtain an identical band, thus both, phenotypic and genotypic studies, complement each other. The molecular techniques used to typify bacterial strains are known to be statistically significant in discriminatory power and reproducibility, standardization, and interpretation, making them indispensable in any epidemiological study (Palomino-Camargo and González-Muñoz, 2014).

The isolates related through the ERIC-PCR profile also showed a relationship with their antibiotic resistance profile. This has been previously reported in enterococcal isolates from hospitalized patients, which were related to their ERIC band profile and antibiogram. A similar resistance pattern among isolates classified in the same group could indicate that they came from a common site and have both chromosomal genes and resistance mechanisms (Zalipour *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONS

This study shows the prevalence of *E. casseliflavus* isolates in chicken viscera. A high percentage of antimicrobial resistance was observed to aminoglycoside and macrolide antibiotics; also, the isolates had a worrying resistance percentage to vancomycin. The ERIC-PCR analysis showed high genetic variability among the isolates and a correlation between the antimicrobial and ERIC-PCR profiles.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank to Gutiérrez-Franco, L. E. for proofreading.

## CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest.

## REFERENCES

Aarestrup, F.M., Butaye, P. and Witte, W. 2002 Non-human reservoirs of enterococci. In *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Washington DC: ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817923.ch2>

Alós, J.I. 2015 Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33(10): 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>

Ardakani, M.A. and Ranjbar, E. 2016. Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method. *Electronic Physician*. 8(4): 2291-2296. <http://dx.doi.org/2291>



- Alzahrani, O.M., Fayez, M., Alswat, A.S., Alkafafy, M., Mahmoud S., Al-Marry, T., Almuslem, A., Ashfaq, H. and Yusuf, S. 2022. Antimicrobial resistance, biofilm formation, and virulence genes in *Enterococcus* species from small backyard chicken flocks. *Antibiotics* 11(3): 320. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030380>
- Bedendo, J. and Pignatari, A. C. 2000. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 33(11): 1269-1274. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000001100002>
- Beganovic, M, Luther, M.K., Rice, L.B., Arias C.A., Rybak M.J. and LaPlante K.L. 2018. A re-view of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*. 67(2): 303-309. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy064>
- Blanco, A.E., Barz, M., Cavero D., Icken, W., Sharifi, A.R, Voss, M., Buxadé, C. and Preisinger, R. 2017. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates by chicken embryo lethality assay and ERIC-PCR. *Avian Pathology*. 47: 23-32. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1359404>
- Cabral, A.B., Melo, R. de C., Viera, M.A. and Souza, A.C. 2012. Multidrug resistance genes, including *bla<sub>KPC</sub>* and *bla<sub>CTX-M-2'</sub>* among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45(5): 572-578. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000500007>
- Cercenado, E. 2011. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29: 59-65. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70045-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70045-3)
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. and Łaniewska-Trokenheim, Ł. 2017. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT*. 75: 670-676. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.026>
- CLSI. 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M 100). 32nd Edition. Wayne, P.A.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- Corrales, F. and López-Cánovas, L. 2016. Las infecciones nosocomiales en Cuba y su control mediante las técnicas moleculares de tipificación de microorganismos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 47: 27-32.
- Daniel, D. S., Lee, S. M., Dykes, G. A. and Rahman, S. 2015. Public health risks of multiple-drug-resistant *Enterococcus* spp. in Southeast Asia. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(18): 6090-6097. <https://doi.org/10.1128/AEM.01741-15>
- Devriese, L.A., Pot, B., and Collins, M.D. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(5): 399-408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02794.x>
- DOF. 2015. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. 2015. Disponible: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015)
- Durmaz, S., Bal, E., Gunaydin, M., Yula, E. and Percin, D. 2015. Detection of  $\beta$ -lactamase genes, ERIC-PCR typing and phylogenetic groups of ESBL producing quinolone resistant clinical *Escherichia coli* isolates. *Biomedical Research*. 26(1): 43-50.
- Gallegos, J.C. and Guerrero, J. L. 2004. Resistencia a antibióticos y de alto nivel a aminoglucósidos en enterococcus, aislados de vísceras de pollo de supermercados de Hermosillo Sonora (Bachelor's Theses). Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- García-Galaz, A., Pérez-Morales, R., Díaz-Cinco, M. and Acedo-Feliz, E. 2004. Resistance of *Enterococcus* strains isolated from pigs to gastrointestinal tract and antagonistic effect against *Escherichia coli* K88. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 46(1-2), 5-11.
- Hammerum A.M. 2012 Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection*. 18(7): 619-625. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x>
- Hayes, J.R., English, L.L., Carr, L.E., Wagner, D.D. and Joseph, S. W. 2004. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Applied Environmental Microbiology*. 70(10), 6005-6011. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6005-6011.2004>
- Hidano, A., Takehisa, Y., Yoko, H., Norihiko, M., Sota, K., Takeshi, N., and Toshiyuki, T. 2015. Unraveling antimicrobial resistance genes and phenotype patterns among *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken products in Japan. *PLoS ONE*. 10(3):1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121189>
- Lebreton, F., Willems, R. J., and Gilmore, M. S. 2014. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>
- Marguet, E. R., Vallejo, M., and Olivera, N. L. 2008. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 42(4): 543-548.
- Novais, C., Freitas, A.R., Silveira, E., Antunes, P., Silva, R., Coque, T.M. and Peixe, L. 2013. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(12): 2746-2754. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt289>
- Ortega-González, L. M. 2010. Enterococos: actualización. *Revista Habanera Ciencia Médica*. 9(4): 507-515.
- Ramakrishnan V., Marialouis, X.A., Al-Ansari, M.M., Al-Humaid L., Santhanam A., and Obulisamy K. 2022. Multilocus sequence typing and ERIC-PCR fingerprinting of virulent clinical isolates of uropathogenic multidrug resistant *Escherichia coli*. *Journal of King Saus University- Science*. 34: 101874. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101874>
- Palomino-Camargo, C., and González-Muñoz, Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 31: 535-546.
- Price, V.J., McBride, S.W., Duerkop, B.A. and Palmer, K.L. 2018. CRISPR-Cas blocks antibiotic resistance plasmid transfer between *Enterococcus faecalis* strains in the gastrointestinal tract. *bioRxiv* 312751. <https://doi.org/10.1101/312751>
- Woolhouse, M., Ward, M., Van Bunnik, B. and Farrar, J. 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 370:20140083. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>

- Wijetunge, D.S., Dunn, P., Wallner-Pendleton, E., Lintner, V., Lu, H. and Kariyawasam, S. 2012 Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24: 1166-1171. <https://doi.org/10.1177/1040638712463563>
- Wright, M. H., Adelskov, J. and Greene, A. C. 2017. Bacterial DNA Extraction using individual enzymes and Phenol/Chloroform separation. *Journal of Microbiology and Biology Education*. 18(2): 1-3. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v18i2.1348>
- Zalipour, M., Esfahani, B. N., and Havaei, S. A. 2019. Phenotypic and genotypic characterization of glycopeptide, aminoglycoside and macrolide resistance among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*: a multicenter based study. *BMC Research Notes*. 12(1): 292. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4339-4>

# Influencia de la temperatura en la infectividad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* en *Vanilla planifolia* y en híbridos *V. planifolia* x *V. pompona*

Influence of temperature on the infectivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in *Vanilla planifolia* and in hybrids *V. planifolia* x *V. pompona*

J.M. Barreda-Castillo<sup>1</sup>, R.A. Menchaca-García<sup>1</sup>, A. Pérez-Silva<sup>2</sup>, N.G. Sánchez-Coello<sup>3</sup> and M. Luna-Rodríguez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Tropicales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico Nacional de México, Tuxtepec, Oaxaca, México.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

## RESUMEN

*Vanilla planifolia* es la principal fuente vegetal de vainillina, saborizante de amplia importancia comercial. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, principal patógeno de *V. planifolia*, ha devastado cultivos enteros a nivel mundial. *Vanilla pompona* posee resistencia a patógenos comunes del género. Variaciones climáticas extremas repercuten en las interacciones planta-patógeno. A partir del supuesto de que temperaturas superiores a 28 °C intensifican la infectividad de *F. oxysporum* en vainilla, se determinó la influencia del incremento de la temperatura en la infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) en *V. planifolia* y dos híbridos de *V. planifolia* x *V. pompona*. Se inocularon raíces de esquejes de *V. planifolia* y de los híbridos con suspensiones de esporas del hongo. Se midió el avance de la enfermedad durante 60 días a 25, 30 y 35 °C. Se emplearon cinco réplicas por tratamiento, incluyendo un lote testigo. Se utilizó ANOVA *post hoc* Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para analizar los datos. *V. planifolia* fue susceptible a 35 °C y altamente susceptible a 25 y 30 °C. Ambos híbridos mostraron resistencia al patógeno en las temperaturas evaluadas. Por la resistencia mostrada, los híbridos de *V. planifolia* x *V. pompona* son una alternativa viable ante el patógeno.

**Palabras clave:** Vainilla, pudrición de raíz y tallo, vigor híbrido, cambio climático.

## ABSTRACT

*Vanilla planifolia* is the main vegetable source of vanillin, a flavoring of wide commercial importance. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, the main *V. planifolia* pathogen, has devastated whole crops worldwide. *Vanilla pompona* possesses resistance to common genus pathogens. Extreme climatic variations affect the plant-pathogen interactions. Based on the assumption that temperatures above 28 °C will intensify the infectivity of *F. oxysporum* in vanilla, we determined the influence of the increase in temperature on the infectivity of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (strain M21C5) in *V. planifolia* and two hybrids of *V. planifolia* x *V. pompona*. Root cuttings from hybrids 1 and 2 (*V. pompona* x *V. planifolia*) and *V. planifolia* were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* spore suspensions. Disease progression was measured for 60 days at 25, 30 and 35 °C. Five replicates per treatment were used,

including a control group. ANOVA *post hoc* Tukey test ( $P \leq 0.05$ ) was used for data analysis. *V. planifolia* was susceptible at 35 °C and highly susceptible at 25 and 30 °C. Both hybrids were resistant to the pathogen at the evaluated temperatures. Due to the resistance, it was shown that *V. planifolia* x *V. pompona* hybrids are a viable alternative to the pathogen.

**keywords:** Vanilla, root and stem rot, hybrid vigor, climate change.

## INTRODUCCIÓN

La vainilla es una orquídea originaria de México y de ella se obtiene la vainillina, uno de los productos aromáticos más demandados a nivel mundial que se obtiene de las vainas de vainilla mediante un proceso de extracción con alcohol etílico (Mendoza Sánchez *et al.*, 2021). Las especies de vainilla de mayor importancia en el mercado son *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*. El 95 % de la vainilla comercializada en el mundo corresponde a *V. planifolia* (Bory *et al.*, 2008). *V. pompona* es de menor uso, casi restringido a la perfumería, pero cuenta con la característica de ser una de las especies del género más resistente a patógenos y cambios ambientales (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007; Sinha *et al.*, 2008). Entre 2019 y 2020, Madagascar, Indonesia y México generaron el 77.2 % (5739 t) de la vainilla que se produjo en el mundo (FAO, 2022). Por su parte, Estados Unidos, Francia y Alemania juntos representan alrededor del 80 % del comercio mundial de vainilla (Businesscoot, 2022).

Todas las especies de plantas cultivadas tienen desafíos de enfermedades. La vainilla se propaga fácilmente por esquejes y es genéticamente uniforme en todas las áreas de producción, no obstante, este método no garantiza la calidad de las nuevas plantaciones (Carranza-Álvarez *et al.*, 2021). La propagación vegetativa facilita la transmisión de enfermedades (Chambers, 2019). *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, patógeno fúngico más dañino de la vainilla, ha causado la pérdida de cultivos enteros en países como Puerto Rico y Costa Rica (Bayman, 2019; Varela-Quirós, 2019). Una vez que el hongo penetra a la planta por la raíz, los síntomas inician con lesiones de color café, seguido de ennegrecimiento y desecación del tejido, causando posteriormente la pudrición de la base del tallo, lo que conlleva a la pérdida de hojas, afec-

\*Autor para correspondencia: Mauricio Luna Rodríguez

Correo electrónico: mluna@uv.mx

Recibido: 20 de abril de 2022

Aceptado: 25 de octubre de 2022

tando la floración y eventualmente, la muerte de la planta (Hernández-Hernández, 2011).

El desarrollo de híbridos de vainilla genera plantas resistentes a sequías, a cambios ambientales bruscos o a los patógenos, ya que los híbridos suelen tener mejores características que los organismos parentales (vigor híbrido), con lo cual se producen genotipos con menores necesidades culturales, como la aplicación de agroquímicos en beneficio hacia un cultivo orgánico (Lippman y Zamir, 2006; Paniagua-Vásquez *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se propuso determinar la influencia de la temperatura en el grado de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* en *V. planifolia* y sus híbridos con *V. pompona*, en busca de contestar la interrogante a los escenarios fitosanitarios que podrían generarse para el cultivo, a partir de los cambios en la temperatura de los agrosistemas en consecuencia del cambio climático.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

El material de *V. planifolia* y de los híbridos fue donado del acervo de vainillas que resguarda el orquidario CITRO, en Xalapa, Veracruz, México. Los híbridos *V. planifolia* x *V. pompona* (híbrido 1) y *V. pompona* x *V. planifolia* (híbrido 2) corresponden a individuos adultos de 10 años generados en la investigación doctoral de Rebeca Menchaca-García en 2012. Se descartó el uso de *V. pompona* en el experimento debido a su baja capacidad de enraizamiento en las condiciones experimentales empleadas. La cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* M21C5 pertenece a la colección del Laboratorio de Genética e Interacciones Planta Microorganismos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, Veracruz.

### Enraizamiento de esquejes

Para inducir la generación de raíces en los esquejes se empleó el método propuesto por Solano-de la Cruz *et al.* (2019). Los bejucos de *V. planifolia* y de los híbridos fueron previamente sanitizados externamente mediante lavados con solución de detergente líquido de uso doméstico por 10 minutos y enjuagados con agua esterilizada, posteriormente, se sumergieron en solución de cloro comercial (10 gotas/L) durante 5 min y se enjuagaron con agua destilada esterilizada. Para obtener los esquejes se cortaron los tallos bajo condiciones de asepsia en campana de flujo laminar. Cada esqueje consistió en una fracción del tallo de vainilla de apariencia sana, con dos nudos de longitud (aproximadamente 30 cm) y dos hojas. Cada esqueje se colocó en cámara húmeda elaborada con charola de unicel con papel absorbente previamente esterilizado, humedecido con agua destilada esterilizada y se cubrió con polipropileno para evitar la desecación. Las charolas con los esquejes se mantuvieron en oscuridad a  $25 \pm 2$  °C, con humedad relativa de 90 – 100 % durante 40 d. Se adicionó musgo *Sphagnum* como sustrato para mantener humedad según lo propuesto por Koyyappurath *et al.* (2016).

### Pruebas de patogenicidad

Bajo condiciones de asepsia en campana de flujo laminar (ECOSHEL-CV1) se realizó una incisión menor a un centímetro en la zona apical de la raíz del esqueje, donde se inoculó un fragmento de aproximadamente 5 mm de diámetro de medio PDA con micelio de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) de siete días de desarrollo. Después de la inoculación del patógeno las cámaras húmedas se colocaron en incubadoras microbiológicas (FELISA) a 25, 30 y 35 °C  $\pm$  1 °C durante 60 d. Los esquejes se hidrataron dos veces por semana adicionando 15 mL de agua destilada esterilizada a la charola; cada charola se mantuvo cubierta con una película de polipropileno. Los grupos testigos consistieron en esquejes no inoculados con el patógeno. Se emplearon cinco esquejes por cada grupo experimental y grupos testigos.

Para evaluar el grado de infectividad se midió el porcentaje de raíz afectada por el patógeno, siendo esta la relación entre el área afectada y el área total de la raíz. Se consideró como afectación la presencia de síntomas típicos de esta enfermedad. Para su evaluación se empleó el análisis de imagen digital mediante el software ImageJ 1.8.0. (Schneider *et al.*, 2012) a partir de registros fotográficos del avance del síntoma causado por el hongo, tres veces por semana durante 60 días.

Para determinar el grado de infección en los esquejes se utilizó la escala descrita por Koyyappurath *et al.* (2016) y modificada por Grisoni, Com. pers. (02 de noviembre 2018) (Tabla 1). A partir del grado de infectividad del patógeno se infirió el grado de resistencia de la vainilla al patógeno como se indica en la Tabla 1.

### Influencia de la temperatura en la infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

Se establecieron 25, 30 y 35 °C para determinar la influencia de la temperatura en la capacidad infectiva del hongo con base en las investigaciones que se detallan a continuación. Se estableció 25 °C, por ser la temperatura óptima de crecimiento para el patógeno de acuerdo con Ramos-Quintana *et al.* (2017), 30 °C por ser la temperatura promedio que se alcanza en un vainillar durante los meses cálidos de las zonas de cultivo (Hernández-Hernández, 2011) y 35 °C para simular el posible aumento de temperatura debido al cambio climático (Tejeda-Martínez y Rodríguez-Viqueira, 2006). Para simular los ambientes térmicos se utilizaron estufas de incubación microbiológicas verificadas con termómetro de mercurio.

**Tabla 1.** Correspondencia del grado de resistencia de *Vanilla* sp. con el grado de infectividad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*.

**Table 1.** Correspondence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* degree of infectivity with the *Vanilla* sp degree of resistance.

% raíz dañada	Grado de infectividad de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	Grado de resistencia de <i>Vanilla</i> sp.
0 - 10	No infectivo	Altamente resistente
10 - 22	Ligeramente infectivo	Ligeramente resistente
22 - 82	Infectivo	Susceptible
82 - 100	Altamente infectivo	Altamente susceptible



**Análisis estadísticos**

Se utilizó un diseño factorial completamente al azar. Para las pruebas de patogenicidad se utilizó la prueba análisis de varianza (ANOVA) *post hoc* Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para determinar diferencias estadísticas entre *V. planifolia* y los organismos híbridos. Esto fue realizado para cada una de las tres temperaturas utilizadas en el presente estudio. Para determinar la influencia de la temperatura en la infectividad se utilizó la prueba ANOVA de dos vías ( $P \leq 0.05$ ). Los porcentajes de raíz infectada fueron previamente transformados para ajustarse a los supuestos estadísticos necesarios mediante la función arcoseno. Las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete *Rmisc* (Hope, 2013) y *agricolae* (Mendiburu, 2019) del software R versión 3.6.0. Se empleó el software R y el paquete *ggplot2* para la obtención de los gráficos (Wickham, 2016).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Pruebas de patogenicidad**

**Infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* a 25 °C**

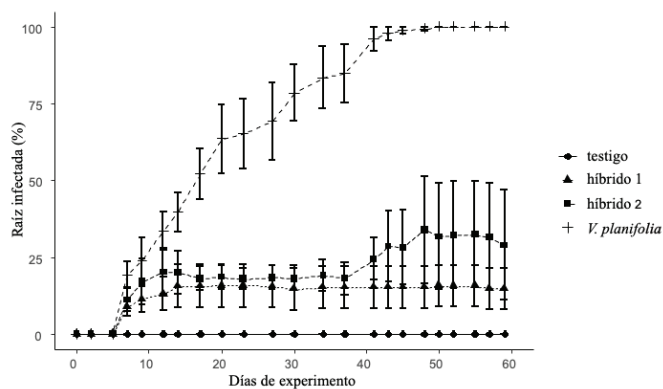
Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ) respecto al daño causado por el hongo a 25 °C entre *V. planifolia* y los híbridos (Tabla 2). Se observó un cambio notorio en la coloración de la raíz de *V. planifolia* y síntomas de pudrición a partir del día siete después de la inoculación por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. En comparación, ambos híbridos solo presentaron un ligero cambio de coloración en la zona donde se inoculó el hongo. Para el día 17 se observó un avance del daño del 50 % de las raíces en *V. planifolia*, en tanto que, en ambos híbridos el daño estuvo restringido a la zona de inoculación (Figura 1). A los 60 d del experimento, *V. planifolia* fue la más afectada al presentar todos sus individuos muertos a causa del hongo, mientras que ambos híbridos presentaron lesiones menores al final de la prueba. No se observaron cambios en las plantas de los grupos testigo. A partir del grado de infectividad se infirió que *V. planifolia* fue altamente susceptible al patógeno, a diferencia con ambos híbridos que mostraron ser ligeramente resistentes (Tabla 3).

**Infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* a 30 °C**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ) respecto al daño causado por el hongo a 30 °C entre *V. planifolia* y los híbridos (Tabla 4). *V. planifolia*, a

**Tabla 2.** Infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) en *Vanilla planifolia* y los híbridos 1 y 2 (*Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona*) a 25 °C.  
**Table 2.** *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (strain M21C5) infectivity in *Vanilla planifolia* and hybrids 1 and 2 (*Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona*) at 25 °C.

Variable	Df	F	Valor de P
Día	21	10.18	< 0.01
Vainilla	4	167.611	< 0.01
Post hoc Tukey			
Comparación	Valor de P	Comparación	Valor de P
Híbrido 1 vs híbrido 2	0.63	Testigo vs híbrido 1	< 0.01
Híbrido 1 vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01	Testigo vs híbrido 2	< 0.01
Híbrido 2 vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01	Testigo vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01



**Figura 1.** Daño a raíces de vainilla debido a infección por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) a 25 °C, durante los 60 d de prueba.  
**Figure 1.** Damage to vanilla roots due to *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (M21C5 strain) infection at 25 °C, during the 60 d of testing.

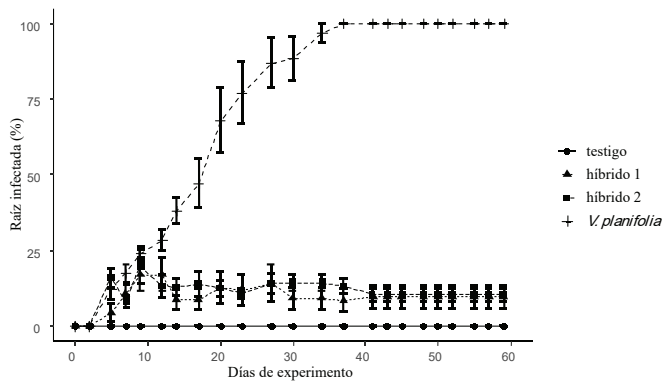
**Tabla 3.** Correspondencia del grado de infectividad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) y del grado de resistencia de *Vanilla* a 25 °C.  
**Table 3.** Correspondence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* degree of infectivity with the *Vanilla* sp. degree of resistance at 25 °C.

Organismo	Porcentaje raíz dañada	Grado de infectividad de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	Grado de resistencia de <i>Vanilla</i>
z	100 ± 0	Altamente infectivo	Altamente susceptible
Híbrido 1	14.844 ± 6.721	Ligeramente infectivo	Ligeramente resistente
Híbrido 2	28.902 ± 17.922	Ligeramente infectivo a infectivo	Ligeramente resistente a susceptible
Grupos testigo	0	-	-

**Tabla 4.** Infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) en *Vanilla planifolia* y los híbridos 1 y 2 (*Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona*) a 30 °C.  
**Table 4.** *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (strain M21C5) infectivity of in *Vanilla planifolia* and hybrids 1 and 2 (*Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona*) at 30 °C.

Variable	Df	F	Valor de P
Día	21	8.187	< 0.01
Vainilla	4	369.367	< 0.01
Post hoc Tukey			
Comparación	Valor de P	Comparación	Valor de P
Híbrido 1 vs híbrido 2	0.32	Testigo vs híbrido 1	< 0.01
Híbrido 1 vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01	Testigo vs híbrido 2	< 0.01
Híbrido 2 vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01	Testigo vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01

diferencia de los híbridos, presentó daños más severos desde el día siete después de la inoculación del patógeno (Figura 2), la pudrición total de la raíz en todos los individuos a los 37 d y la muerte de todas las plantas a los 60 d, demostrando ser altamente susceptible a esta temperatura (Tabla 5). Ambos híbridos presentaron alta resistencia al patógeno (Tabla 5), dado que al final de la prueba, las plantas solo mostraron la muerte de tejido en la zona donde se inoculó el hongo. Se observó estrangulamiento del tejido, como una forma de restringir el avance de la enfermedad al resto de la planta (Figura 3).



**Figura 2.** Daño a raíces de vainilla debido a infección por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) a 30 °C, durante los 60 d de prueba.

**Figure 2.** Damage to vanilla roots due to infection by *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (M21C5 strain) at 30 °C, during the 60 d of testing.

**Tabla 5.** Correspondencia del grado de infectividad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) y del grado de resistencia de *Vanilla* sp. a 30 °C.

**Table 5.** Correspondence of the degree of infectivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* with the degree of resistance of *Vanilla* sp. at 30 °C.

Organismo	Porcentaje raíz dañada	Grado de infectividad de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	Grado de resistencia de <i>Vanilla</i>
<i>V. planifolia</i>	100 ± 0	Altamente infectivo	Altamente susceptible
Híbrido 1	9.616 ± 3.713	No infectivo a ligeramente infectivo	Altamente resistente a ligeramente resistente
Híbrido 2	10.31 ± 2.145	No infectivo a ligeramente infectivo	Altamente resistente a ligeramente resistente
Grupos testigo	0	-	-



**Figura 3.** Aspecto del daño causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* en raíz de *Vanilla planifolia* a los 17 d después de la inoculación a 25 y 30 °C (imagen izquierda); en los híbridos 1 (*V. planifolia* x *V. pompona*) y 2 (*V. pompona* x *V. planifolia*) a los 60 d después de la inoculación, incubados a 35 °C (imagen central y derecha).

**Figure 3.** Appearance of the damage caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in *Vanilla planifolia* root at 17 d after inoculation at 25 and 30 °C (left image); in hybrids 1 (*V. planifolia* x *V. pompona*) and 2 (*V. pompona* x *V. planifolia*) at 60 d after inoculation, incubated at 35 °C (center and right image).

### Infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* a 35 °C

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ) respecto al daño causado por el hongo a 35 °C entre *V. planifolia* y los híbridos, y entre el híbrido 1 y el híbrido 2 (Tabla 6). *V. planifolia* presentó daño en la raíz desde el segundo día después de la inoculación haciéndose más evidente al quinto día (Figura 4), mientras que para los organismos híbridos el daño se evidenció en el día cinco. *V. planifolia* presentó mayor infectividad del patógeno por lo que fue más susceptible a lo largo del experimento, en contraste con los híbridos (Tabla 7), pero en menor magnitud en comparación con la alta infectividad mostrada a temperaturas de 25 y 30 °C. El híbrido 1 presentó ligeramente mayor avance del patógeno en comparación con el híbrido 2 (Figura 4). Al igual que a 30 °C, ambos híbridos generaron un área de estrangulamiento de la raíz próxima a la zona de inoculación del patógeno (Figura 3). El híbrido 2 generó esta respuesta desde el noveno día, en tanto que el híbrido 1 la desarrolló a los 17 d.

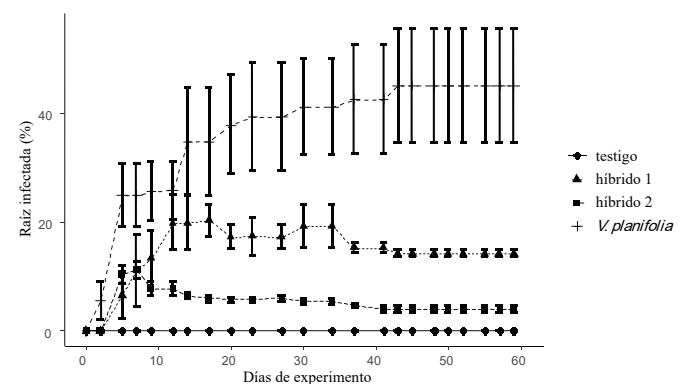
### Influencia de la temperatura en la infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para cada tipo de vainilla bajo estudio ( $P < 0.01$ , D.F. = 6,  $F = 37.038$ ). Las plantas de *V. planifolia* tuvieron el 100 % de raíces infectadas por el hongo a 25 y 30 °C, y murieron durante el transcurso del experimento; esta respuesta no

**Tabla 6.** Infectividad de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) en *Vanilla planifolia* y los híbridos 1 y 2 (*Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona*) a 35 °C.

**Table 6.** Infectivity of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (strain M21C5) in *Vanilla planifolia* and hybrids 1 and 2 (*Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona*) at 35 °C.

Variable	Df	F	Valor de p
Día	21	8.144	< 0.01
Vainilla	4	381.799	< 0.01
Post hoc Tukey			
Comparación	Valor de p	Comparación	Valor de p
Híbrido 1 vs híbrido 2	< 0.01	Testigo vs híbrido 1	< 0.01
Híbrido 1 vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01	Testigo vs híbrido 2	< 0.01
Híbrido 2 vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01	Testigo vs <i>V. planifolia</i>	< 0.01



**Figura 4.** Porcentaje de daño a raíces de vainilla debido a infección por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) a 35 °C, durante los 60 d de prueba.

**Figure 4.** Damage to vanilla roots due to infection by *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (M21C5 strain) at 35 °C, during the 60 d of testing.

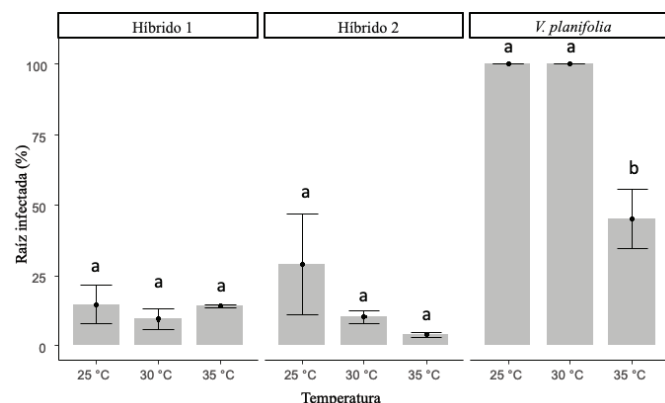
**Tabla 7.** Correspondencia del grado de infectividad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) y del grado de resistencia de *Vanilla* sp. a 35 °C.

**Table 7.** Correspondence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* degree of infectivity with the *Vanilla* sp. degree of resistance at 35 °C.

Organismo	Porcentaje de raíz dañada	Grado de infectividad de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	Grado de resistencia de <i>vanilla</i> sp.
<i>V. planifolia</i>	45.139 ± 10.473	Infectivo	Susceptible
Híbrido 1	14.231 ± 0.558	Ligeramente infectivo	Ligeramente resistente
Híbrido 2	3.96 ± 0.796	No infectivo	Altamente resistente
Grupos testigo	0	-	-

ocurrió a 35 °C, donde la enfermedad no logró desarrollarse más del 50 % de las raíces (Figura 5). Para el híbrido 1, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, aun cuando a 30 °C hubo menor evidencia de la enfermedad. De igual manera, para el híbrido 2 a 35 °C no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, el daño de la raíz fue más evidente a 25 °C.

En resumen, *Vanilla planifolia* presentó alto grado de susceptibilidad ante *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, en tanto que, los híbridos fueron resistentes, independientemente de la temperatura evaluada. Se ha reportado que *V. planifolia* no presenta resistencia ante este patógeno (Irvine *et al.*, 1964; Alconero, 1968) y que *V. pompona* es resistente, por lo que se ha planteado que organismos híbridos entre estas especies deberán heredar esta cualidad (Ploetz, 2006; Koyyappurath *et al.*, 2015; 2016). Los resultados confirman que la resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* se hereda en los híbridos de *V. planifolia* x *V. pompona*, sin importar si *V. planifolia* es la receptora o donadora del polen. Se sabe que *V. pompona* posee grandes depósitos de lignina en las células de las raíces, propiedad básica a la que se atribuye la resistencia al funcionar como una barrera que imposibilita el avance del hongo (Prell y Day, 2001; Koyyappurath *et al.*, 2016), esto puede expresarse también en los híbridos.



**Figura 5.** Daño de la raíz de vainilla causado por la infección de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (cepa M21C5) a 25, 30 y 35 °C. Los individuos de los grupos testigo para cada tratamiento no presentaron daño.

**Figure 5.** Vanilla root damage caused by *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (strain M21C5) at 25, 30 and 35 °C. The individuals of the control groups for each treatment did not present damage.

Belanger y Havkin-Frenkel (2019) señalan que los híbridos de *V. planifolia* con especies de vainilla resistentes a este hongo, como *V. aphylla*, *V. pompona* o *V. phaeantha*, heredan la característica de resistencia y hacen énfasis en el híbrido *Vanilla* cv. *Vaitsy* (*V. planifolia* x *V. pompona* x *V. planifolia*), del cual mencionan, es sumamente resistente al patógeno y genera idioblastos en las raíces para dificultar el avance del hongo. Los idioblastos son células distintas al tejido del que forman parte, por su función secretora poseen amplia variedad de sustancias: aceites, resinas, mucílagos, gomas, taninos, cristales. Idioblastos que acumulan taninos (células taníferas) se encuentran en todos los órganos vegetales, variando la cantidad de tanino producido y acumulado, según la especie. Los taninos son compuestos fenólicos astringentes que sirven como defensa del ataque de hongos, otros patógenos y parásitos.

La formación de idioblastos con cristales de rafuro de oxalato de calcio han sido reportados en las raíces adventicias de *V. planifolia* (Kausch y Homer, 1983), sin embargo, su formación ha sido relacionada con el crecimiento y desarrollo de las plantas incluyendo la regulación de calcio de alta capacidad, la protección contra herbivoría y la tolerancia a metales pesados, no así como defensa ante microorganismos, lo cual podría estar confirmándose en el presente estudio. Otros idioblastos que se han relacionado con función importante en la defensa de la planta ante insectos y microorganismos son las células de mirosina, que poseen la enzima mirosinasa responsable de la generación de productos tóxicos que contienen nitritos (Evert, 2008), no obstante, no hay estudios que evidencien la existencia de estas estructuras en vainilla.

En cuanto al efecto de la temperatura en la capacidad infectiva de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* se observó que a 25 y 30 °C, el patógeno ocasionó la muerte de todas las plantas de *V. planifolia*, por lo cual, se remarca que la especie es altamente susceptible (Irvine *et al.*, 1964; Alconero, 1968) y no obstante que ninguno de los individuos híbridos murió, el hongo si tuvo capacidad infectiva a 25 °C sobre estos y, esta disminuyó conforme se incrementó la temperatura. Se ha indicado que *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* presenta buen desarrollo en el intervalo de temperatura entre 23 y 28 °C con un óptimo a los 25 °C, incluso ha mostrado capacidad para desarrollarse a 32 °C (Gandara *et al.*, 2010; Benaouali *et al.*, 2014); a temperaturas más altas el hongo se ve inhibido y se ha propuesto que hay menor probabilidad de que mantenga la capacidad de causar enfermedad (Agrios, 2010; Ramos-Quintana *et al.*, 2017), no obstante, los resultados evidenciaron que el patógeno causó daño hasta del 50 % de la raíz de *V. planifolia* a 35 °C y permite proponer que, si bien, el patógeno no causó la muerte de las plantas, en condiciones de cultivo traería consecuencias en el desarrollo de ésta, debido a la mala absorción de nutrientes.

Si bien, por las características propias de la familia Orchidaceae, *V. planifolia* logra sobrevivir en primera instancia, generando nuevas raíces en su condición de sobrevivencia, una vez que sus raíces son dañadas por el primer ataque del patógeno; a mediano plazo, este esfuerzo trae consecuencias



fisiológicas en la planta llevándola a la muerte, debido a que las nuevas raíces se encontrarán nuevamente con el patógeno que permanece en el sustrato.

En las orquídeas, donde la planta sostiene importantes relaciones simbióticas mutualistas benéficas con hongos micorrizógenos resulta desacertado combatir enfermedades fúngicas de raíz por métodos químicos, por lo que una opción sería desarrollar variedades resistentes o tolerantes. En los programas de mejora de la vainilla, se ha puesto la mirada en *V. pompona*, que es una planta xerófila que logra sobrevivir entre 13 a 30 °C ante precipitaciones bajas, lográndose encontrar poblaciones espontáneas en zonas secas (Soto-Arenas y Dressler, 2009; Flores-Jiménez *et al.*, 2016); cualidad que significa un elemento favorable ante un posible escenario por el incremento de la temperatura en las zonas de cultivo, en consecuencia del cambio climático, dado que *V. planifolia* a temperaturas mayores de 32 °C presenta amarillamiento, pérdida de viabilidad de polen y caída de frutos (Hernández-Hernández, 2011; INIFAP, 2016).

## CONCLUSIONES

Se constató la alta susceptibilidad de *V. planifolia* a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* a temperaturas desde 25 a 35 °C, por lo que se considera que son las características genéticas de la especie y el manejo del cultivo, y no la temperatura, el factor influyente sobre el desarrollo de la enfermedad en las zonas usuales de cultivo. Los híbridos de *V. planifolia* x *V. pompona* fueron resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* sin importar que especie parental fue donador o receptor del polen y por tanto, son una alternativa viable que marca la pauta para programas de mejoramiento genético de la vainilla bajo el planteamiento de nuevas líneas de investigación que atiendan, además de la resistencia a patógenos, diversos aspectos de importancia agrícola encaminados a mantener o mejorar el rendimiento de los cultivos, con miras a satisfacer la demanda de vainilla en el mercado mundial ante un escenario cambiante.

## AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt por el financiamiento otorgado al proyecto número 29748 "Estrategias para la adaptación y mitigación al cambio climático necesarias para el rescate del cultivo de la vainilla en México".

## REFERENCIAS

- Agrios, G. N. 2010. Fitopatología. 5th ed. Limusa. USA.
- Alconero, R. 1968. Infection and development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in *Vanilla* roots. *Phytopathology*. 58: 1281-1283.
- Bayman, P. 2019. The History of Vanilla in Puerto Rico: Diversity, Rise, Fall, and Future Prospects. En: *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Havkin-Frenkel D. and Belanger F. (ed). p 111. Wiley-Blackwell. England. <https://doi.org/10.1002/9781119377320.ch7>
- Belanger, F. y Havkin-Frenkel, D. 2019. Molecular analysis of a vanilla hybrid cultivated in Costa Rica. En: *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Havkin-Frenkel D. and Belanger F. (ed). p 391. Wiley-Blackwell. England. <https://doi.org/10.1002/9781444329353.ch15>
- Benaouali, H., Hamini, N., Bouras, A., Benichou, S.L., Kihal, M. y Henni, J. 2014. Isolation, pathogenicity test and physicochemical studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *Advances in Environmental Biology*. 8: 36-49. [https://www.researchgate.net/publication/280445975\\_Isolation\\_pathogenicity\\_test\\_and\\_physicochemical\\_studies\\_of\\_Fusarium\\_oxysporum\\_fsp\\_radicis\\_lycopersici](https://www.researchgate.net/publication/280445975_Isolation_pathogenicity_test_and_physicochemical_studies_of_Fusarium_oxysporum_fsp_radicis_lycopersici)
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.F. y Besse, P. 2008. Biodiversity and preservation of Vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55(4): 551-571.
- Businesscoot. The Vanilla Market / United States. [Consultado 12 de junio 2022] 2022. Disponible en: <https://www.businesscoot.com/en/study/the-vanilla-market-united-states>
- Carranza-Álvarez, C., Trinidad-García, K.L., Reyes-Hernández, H., Castillo-Pérez, L.J. y Fortanelli-Martínez, J. 2021. Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biotecnia*. 23(1): 5-12. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.805>
- Chambers, A.H. 2019. Vanilla (*Vanilla* spp.) Breeding. En: *Advances in plant breeding strategies: Industrial and food crops*. Al-Khayri J.M., Mohan J.S., Johnson D.V. (ed). p 744. Springer. Suiza. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8>
- Evert, R.F. 2008. *Esau Anatomía Vegetal*. Ediciones Omega. España.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). FAOSTAT: Crops and livestock products [Consultado 12 de junio 2022] 2022. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- Flores-Jiménez, A., Reyes-López, D., Jiménez-García, D., Romero-Arenas, O., Rivera-Tapia, J.A., Huerta-Lara, J.A. y Pérez-Silva, A. 2016. Diversidad de *Vanilla spp* (Orchidaceae) y sus perfiles bioclimáticos en México. *Revista de Biología Tropical*. 65: 975-987. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i3.29438>
- Gandara, B., Saifulla, R. y Basavaraja, M.K. 2010. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, the causal agent of stem rot of *Vanilla* in vitro. *International Journal of Science and Nature*. 1: 259-261.
- Hernández-Hernández, J. 2011. Vanilla diseases. En: *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Havkin-Frenkel D. and Belanger F. (ed). p 27. Wiley-Blackwell. England. <https://doi.org/10.1002/9781444329353.ch2>
- Hope, R. 2013. Rmisc: Ryan Miscellaneous. [Consultado 8 Septiembre 2019]. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=Rmisc>
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2016. Paquete tecnológico para cultivar vainilla en San Luis Potosí. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Noreste, México.
- Irvine, J., Theis, T., Jimenez, F.A. y Freyre, R.H. 1964. Techniques for evaluating reactions of *Vanilla* to *Fusarium* root rot. *Phytopathology*. 54: 827-831.
- Kausch, A.P. y Homer, H.T. 1983. Development of syncytial raphide crystal idioblasts in the cortex of adventitious roots of *Vanilla planifolia* L. (Orchidaceae). Tesis de Doctorado. Iowa State University. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8205637>



- Koyyappurath, S., Atuahiva, T., Le Guen, R., Batina, H., Le Squin, S., Gautheron, N., Hermann, V., Peribe, J., Jahiel, M., Steinberg, C., Liew, E., Alabouvette, C., Besse, P., Dron, M., Sache, I., Laval, V. y Grisoni, M. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of *Vanilla*. *Plant Pathology*. 65:612-625. <https://doi.org/10.1111/ppa.12445>
- Koyyappurath, S., Conejero, G., Dijoix, J., Lapeyre, F., Jade, K., Chiroleu, F., Gatineau, J., Besse, P. y Grisoni, M. 2015. Differential responses of *Vanilla* accessions to root rot and colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01125>
- Lippman, Z. y Zamir, D. 2006. Heterosis revisiting the magic. *Genetics*. 23:60-66. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.12.006>
- Menchaca-García, R.A. 2012. Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Tropicales, Veracruz. <https://www.uv.mx/det/files/2012/06/MenchacaGarciaRebecaAlicia.pdf>
- Mendiburu, F. 2019. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. [Consultado 8 Septiembre 2019] Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Mendoza Sánchez, L.G., Rodríguez España, L., Martínez Rodríguez, J., García Galindo, H.S., De la Cruz Medina, J., Cano Sarmiento, C. y Monroy Rivera, J.A. 2021. Evaluación del desarrollo y la estabilidad de una nanoemulsión de vainilla (*Vanilla planifolia*) a partir de un extracto no alcohólico. *Biotecnia*. 23(3): 22-29. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i3.1409>
- Paniagua-Vásquez, A., Azofeifa-Bolaños, B. y García-García, J. A. 2013. Cultivo de la vainilla en sistemas agroforestales. *Universidad en diálogo*. 3: 31-46. <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/dialogo/article/view/6434>
- Ploetz, R.C. 2006. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology*. 96: 648-652. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0648>
- Prell, H. y Day, P. 2001. *Plant-Fungal Pathogen Interaction*. 1<sup>st</sup> ed. Springer. USA.
- Ramos-Quintana, F., Bautista-Hernández, A. y Sotelo-Nava, H. 2017. Relación de la temperatura y humedad relativa con el brote del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8(3): 713-720. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i3.44>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. y Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 9: 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sinha, A.K., Sharma, U.K. y Sharma, N. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 59: 299-326. <https://doi.org/10.1080/09687630701539350>
- Solano-De la Cruz, M.T., Adame-García, J., Gregorio-Jorge, J., Jiménez-Jacinto, J., Vega-Alvarado, L., Iglesias-Andreu, L.G., Escobar-Hernández, E.E. y Luna-Rodríguez, M. 2019. Functional categorization of de novo transcriptome assembly of *Vanilla planifolia* Jacks. potentially points to a translational regulation during early stages of infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *BMC Genomics*. 20: 826. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6229-5>
- Soto-Arenas, M.A. y Dressler, R.L. 2009. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their its region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*. 9: 285-354. <https://doi.org/10.15517/LANK.V0I0.12065>
- Soto-Arenas, M.A. y Solano-Gómez, A.R. 2007. Ficha técnica de *Vanilla planifolia*. En: Soto-Arenas MA (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chino A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F. <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Vanillaplanifolia00.pdf>
- Tejeda-Martínez, A. y Rodríguez-Viqueira, L. 2006. Estado de la investigación de los aspectos físicos del cambio climático en México. *Investigaciones Geográficas*. 67: 31-43. <http://www.scielo.org.mx/pdf/igeo/n62/n62a3.pdf>
- Varela-Quirós, E. 2019. Vanilla production in Costa Rica. En: *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Havkin-Frenkel D. and Belanger F. (ed). p 41. Wiley-Blackwell. England. <https://doi.org/10.1002/9781119377320.ch3>
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. [Consultado 8 Septiembre 2019] Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>



# Rendimiento forrajero, grano y calidad del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) tipo Desi

Desi-type chickenpea (*Cicer arietinum* L.) forage yield, grain and quality

R. Avalos-Castro<sup>1</sup>, R. Ramírez-Orduña<sup>2\*</sup>, E. Gutierrez-Perez<sup>1</sup>, C.M. Melgoza-Villagómez<sup>1</sup>, J.A. Acosta-Gallegos<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). CIRNO-C.E. Todos Santos. La Paz, Baja California Sur.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencia Animal y Conservación del Hábitat, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México.

## RESUMEN

Debido a la importancia que tiene el garbanzo tipo *Desi*, en ciertas zonas de México, como alimento para el ganado, la investigación se realizó con el objetivo de evaluar e identificar genotipos sobresalientes en la producción de forraje, grano y calidad nutricional. Para ello, se utilizaron cinco genotipos de garbanzo; cuatro del INIFAP y uno del ICRISAT. Los ensayos de campo se establecieron durante los ciclos agrícolas de otoño-invierno del 2018 - 2019 y 2019 - 2020 de acuerdo con un diseño de bloques completos al azar. Los cinco genotipos mostraron similar rendimiento de grano (3.48 – 3.87 t ha<sup>-1</sup>); la variedad El Patrón presentó el mayor rendimiento biológico (14.21 t ha<sup>-1</sup>), de esquilmos (10.73 t ha<sup>-1</sup>) y mayor capacidad de unidades animal por alimentar. El grano de la variedad San Antonio 05 presentó el más alto contenido de proteína (24.04 %) y la línea experimental ICC-1273, el más bajo (21.55 %). El análisis de preferencia mostró que el genotipo ICC-1273 fue el de mayor calidad nutricional. Todos los genotipos mostraron un contenido importante de minerales, siendo el K<sup>+</sup> (1.35 a 1.44 %) el de mayor concentración.

**Palabras clave:** *Cicer arietinum*, rumiantes, alimentación.

## ABSTRACT

Due to the importance of the *Desi* type chickpea in certain areas of Mexico, as food for cattle, the research was carried out with the objective of evaluate and identify outstanding genotypes to produce forage, grain and nutritional quality, from five chickpea genotypes, four from INIFAP and one from ICRISAT. Field trials were established during the 2018 – 2019 and 2019 – 2020 fall-winter agricultural cycles according to a fully randomized block design. The five genotypes showed similar grain yield (3.48 – 3.87 t ha<sup>-1</sup>); the variety El Patron presented the highest biological yield (14.21 t ha<sup>-1</sup>), waste yield (10.73 t ha<sup>-1</sup>) and the highest capacity of animal units to feed. The grain of the San Antonio 05 variety presented the highest protein content (24.04 %) and the experimental line ICC-1273, the lowest (21.55 %). The preference analysis showed that the ICC-1273 genotype was the one with the highest nutritional quality. All genotypes showed an

important content of minerals, being K<sup>+</sup> (1.35 to 1.44 %) the one with the highest concentration

**Key words:** *Cicer arietinum*, Cattle, feed.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los garbanzos que se siembran en el mundo se producen para el consumo humano (Echevarría-Hernández *et al.*, 2021); en la ganadería, por su importante aporte de proteína y energía, se han utilizado en dietas de animales con el fin de apoyar la producción de leche, carne y huevo; su paja se puede utilizar como alimento para rumiantes (Bampidis y Christodoulou, 2011). Además, su uso permite reducir la compra de alimentos balanceados de alto costo (Soltero-Díaz *et al.*, 2008), por lo que, el conocimiento de su rendimiento y contenido de nutrientes se vuelve importante.

Según la distribución geográfica y color de la semilla, el garbanzo se agrupa en dos tipos, el *Kabuli* que tiene como origen el mediterráneo y Medio Oriente, de grano color blanco a crema y se utiliza principalmente para consumo humano; el tipo *Desi*, que es de origen indú (Chavan *et al.*, 1989), su semilla puede ser de color marrón, marrón claro, leonado, amarillo, naranja, negro o verde; siendo, este último, utilizado en México exclusivamente como alimento para animales.

En algunas zonas de México, específicamente en los estados de Jalisco y Michoacán, la producción de garbanzo *Desi* se realiza en clima subtropical subhúmedo, tanto en condiciones de riego y humedad residual, resaltando que en estas zonas el garbanzo forrajero tiene una gran demanda como alimento molido para el ganado (planta y grano). En condiciones semiáridas se ha observado que se adapta bien con algunas variedades de riego que producen hasta 3.5 t ha<sup>-1</sup> de semilla en la siembra de otoño (Iliadis, 2001). A pesar de su importancia en la alimentación del ganado, los estudios existentes en México se basan en la evaluación del rendimiento y contenido de proteína en cuanto a la calidad nutritiva. Por otra parte, el análisis factorial y el de componentes principales son herramientas útiles para determinar la estructura de las correlaciones entre un gran número de variables a través de la definición de conjuntos de variables altamente interrelacionadas (Salako, 2006). Los procedimientos de análisis de

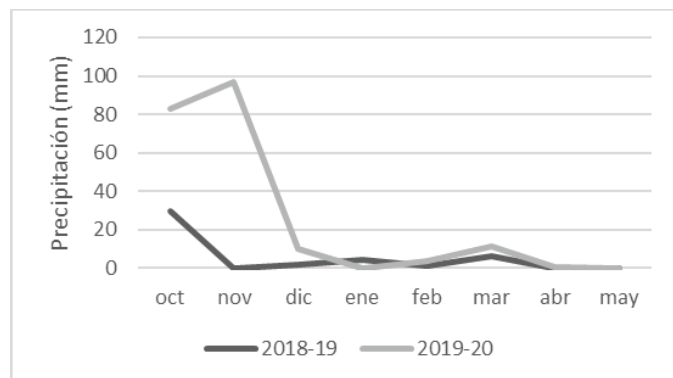
componentes principales y de conglomerados, han resultado ser eficientes para evaluar la diversidad genética de los rasgos agro-morfológicos en garbanzos (Gupta *et al.*, 2011; Kayan y Adak, 2012; Parameshwarappa *et al.*, 2011). Así, estudios que integren características que evalúen el aporte de las diferentes fracciones nutritivas y rendimiento, con técnicas de análisis de componentes principales, pueden apoyar la selección de genotipos sobresalientes en producción animal.

Con la intención de incrementar la información existente sobre el garbanzo forrajero (tipo *Desi*) en México, se realizó el presente estudio con el objetivo evaluar e identificar genotipos sobresalientes en la producción de forraje, grano y calidad nutrimental.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

La investigación se realizó en el Sitio Experimental Valle de Santo Domingo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias localizado a 25° 00' 36" N, 111° 39' 49" O y 48.3 m de altitud, en el municipio de Comondú, Baja California Sur, México. El clima es muy seco, la precipitación media anual es de 200 mm y la temperatura promedio de 22 °C (CONAGUA, 2018). El comportamiento de la precipitación durante los ciclos de estudio se muestra en la Figura 1. En general, los suelos son pobres (0.4 - 0.9 mg kg<sup>-1</sup>) en nitrógeno (N<sup>3-</sup>) total y potasio (K<sup>+</sup>, 9.9 - 28.7 mg kg<sup>-1</sup>), pero ricos en fósforo (P<sup>5+</sup>, 0.9 a 12 mg kg<sup>-1</sup>); predominan valores de pH alcalinos (7.7 - 8.8) y conductividad eléctrica de 1.27 dS m<sup>-1</sup> (Mancera, 2011; López *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Precipitación promedio en el municipio de Comondú, Baja California Sur, México, durante los ciclos agrícolas 2018 - 2019 y 2019 - 2020.  
**Figure 1.** Average rainfall at the Comondú municipality, Baja California Sur, Mexico, during the 2018 - 2019 and 2019 - 2020 agricultural cycles.

### Análisis de características productivas

Se evaluaron los genotipos de garbanzo tipo *Desi* El Patrón, Lerma, Pénjamo, San Antonio 05 procedentes del Campo Experimental El Bajío, en Celaya, Guanajuato y la línea ICC-1273 procedente del ICRISAT, en India. La siembra se realizó en los ciclos agrícolas de otoño - invierno 2018 - 2019 y 2019 - 2020. El diseño utilizado fue bloques completos al azar con tres repeticiones. La superficie de cada bloque fue de 120 m<sup>2</sup>, donde cada genotipo se distribuyó de forma

aleatoria en parcelas de 24 m<sup>2</sup>. La superficie total fue de 360 m<sup>2</sup>. La siembra se realizó de forma manual a una densidad de 15 semillas por m lineal y separación de 80 cm entre surcos.

El control de maleza se realizó con oxifluorfen a dosis de 240 g de i. a. ha<sup>-1</sup> en presiembra e incorporado al momento del riego. La semilla se trató con carboxim + tiram a dosis de 80 g por cada 100 kg. Los riegos se aplicaron con cinta de goteo calibre seis milésimas y goteros separados a 20 cm, con una presión estimada de 11 psi. La lámina de riego total fue de 35 cm. Se fertilizó con la dosis 120 - 70 - 00 (NPK) con las fuentes de UAN 32° y ácido fosfórico. El N se fraccionó en partes iguales y se aplicó a los 15, 30 y 50 d después de la siembra; el P, a los 15 d después de la siembra. A los 130 d después de la siembra se tomaron muestras por tratamiento de una superficie de 4.8 m<sup>2</sup>, las plantas se cortaron a una altura de 5 cm sobre el nivel del suelo, en estas se determinó el rendimiento biológico de forraje (RB), que corresponde a la materia seca total producida por la planta al final del ciclo, como momento máximo de producción vegetativa y que incluye los tallos, hojas y grano en su capsula, el rendimiento de grano (RG), que corresponde a los granos o semillas obtenidas después de la trilla (sin envoltura o cascara de la vaina), y el rendimiento de esquilmos (RE) que corresponde solo a los tallos, hojas y las cascara de las vainas de los granos de garbanzo que se separan al momento de la trilla, en toneladas por hectárea (t ha<sup>-1</sup>) de materia seca (MS). La trilla y limpieza del material se realizó en forma manual. El índice de cosecha (IC) se determinó mediante la fórmula IC = (producción de grano/rendimiento biológico) \* 100 (Kohashi *et al.*, 1980). El análisis bromatológico se realizó del grano de cada genotipo. Además, para cada genotipo se estimó el número de unidades animal (UA) que pudieran ser alimentados. El cálculo se realizó con base en la propuesta del Comité Técnico Consultivo de Coeficientes de Agostadero (COTECO-CA, 1975), bajo el supuesto de que cada UA (vaca de 450 kg con cría al pie) consume 3 % de su peso vivo de forraje (MS), cantidad considerada necesaria para satisfacer necesidades alimenticias y cumplir con su función zootécnica (Gómez *et al.*, 2008).

### Análisis de características de calidad

Las muestras secas de grano se molieron en un equipo eléctrico (Wiley®) con criba de 1 mm y de la harina obtenida se tomó una submuestra para estimar la MS a una temperatura de 100 °C. Con el fin de realizar el análisis de preferencia la producción de grano de los dos ciclos de evaluación fue mezclada y analizada por su contenido de nutrientes y minerales.

### Contenido de Nutrientes

Las muestras secas de grano fueron analizadas por su contenido de nutrientes, la proporción (%) de proteína cruda (PC), por el método Kjeldahl y la grasa (EE), según lo recomendado por la AOAC (1990). La fibra detergente neutra (FDN, %), fibra detergente ácida (FDA, %) y lignina (L, %) se determinaron con base al método ANKOM (2005), siguiendo las recomendaciones hechas por Goering y Van Soest (1970).

La proteína digestible (PD, %) y proteína ligada a la fibra de detergente ácida (NIDA, %) y los carbohidratos no estructurales (CNE, %) fueron utilizados para estimar el contenido de energía neta de mantenimiento (ENm, Mcal Kg<sup>-1</sup>), energía neta de lactancia (ENL, Mcal Kg<sup>-1</sup>), y energía neta de ganancia (ENg, Mcal Kg<sup>-1</sup>), utilizando las ecuaciones del NRC (2000). El consumo de materia seca en base al porcentaje de peso corporal del animal (CMS, % PV) se calculó como 120 / (% FDN). La digestibilidad de la materia seca (DMS, % MS) se determinó como 88.9 - 0.779 \* (FDA) (Moore y Undersander, 2002)

### Contenido de Minerales

Las muestras de grano fueron analizadas por su contenido de macro y microminerales, dentro de los macrominerales, la concentración de fósforo fue estimada por colorimetría (Díaz-Romeau y Hinter, 1988), los macrominerales Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y los microminerales Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup> fueron preparados para el análisis de minerales por el procedimiento de cenizas húmedas (HCl-HNO<sub>3</sub>) a partir de las cenizas obtenidas después de la incineración de las muestras a 550 °C por 6 h (AOAC, 1990) para ser determinados mediante espectrofotometría de absorción atómica con un espectrofotómetro Varian modelo 3000 con una flama aire/acetileno.

### Análisis de preferencia

Para el análisis de preferencia (MDPREF) se realizó con el procedimiento PRINQUAL del SAS (2014), el cual realiza análisis de componentes principales de datos cualitativos, cuantitativos y mixtos, que encuentra transformaciones lineales y no lineales de las variables, utilizando mínimos cuadrados alternos, que optimizan las propiedades de correlación o covarianza matricial de las variables transformadas (Jacinto-Pimienta *et al.*, 2016).

### Análisis estadístico

El diseño utilizado fue bloques completos al azar con arreglo factorial (5 genotipos x 2 ciclos) y tres repeticiones, a los resultados obtenidos del rendimiento biológico, de grano y esquilmos se les aplicó un análisis de varianza con el procedimiento PROC GLM y comparación de medias de tratamientos a través de las pruebas de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), y al análisis de calidad el procedimiento ANDEVA, ambos con el paquete estadístico SAS (2014).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características productivas

Se detectaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) entre los factores, ciclo de siembra y genotipo, excepto para el rendimiento de grano, con diferencia solo entre ciclos. No se observó interacción entre factores (Tabla 1). El efecto del ciclo fue mayor que el de los genotipos para el rendimiento biológico y de grano.

En el ciclo de siembra otoño-invierno 2018 - 2019 se obtuvo mayor rendimiento ( $p \leq 0.05$ ) respecto al ciclo 2019 - 2020 (Tabla 2). Con diferencias que varían de 1 a más de 2 t ha<sup>-1</sup> de rendimiento y de 4 % en el índice de cosecha.

De acuerdo a los resultados de la evaluación promedio de dos ciclos, la variedad El Patrón presentó el mayor rendimiento biológico, rendimiento de esquilmos y el menor índice de cosecha; como se observó en el Tabla 1, no se encontraron diferencias para el rendimiento de grano entre genotipos. Para la cantidad de unidades animal que se pueden mantener por genotipo, tanto para el rendimiento biológico como para el de esquilmos, se observó que la variedad El Patrón y la línea ICC-1273 tienen la mayor capacidad; mientras que Lerma, la menor (Tabla 3).

**Tabla 1.** Cuadrados de la media del análisis de varianza para las variables de producción de cinco genotipos de garbanzo evaluados en los ciclos de siembra 2018 - 2019 y 2019 - 2020.

**Table 1.** Mean Squares of the analysis of variance for the production variables of five chickpea genotypes evaluated in the 2018 - 2019 and 2019 - 2020 sowing cycles.

Fuente de variación	GL	Rendimiento biológico	Rendimiento de grano	Índice de cosecha	Rendimiento de esquilmos
Genotipo	4	5.63**	0.15 ns	65.10**	7.15**
Ciclo	1	38.69**	8.62**	74.19**	10.79**
Genotipo* ciclo	4	0.04 ns	0.19 ns	14.91 ns	0.18 ns
Error	16	0.63	0.19	7.48	0.39
CV (%)		6.22	11.64	9.33	6.96

GL = grados de libertad; CV = coeficiente de variación; \*\* altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ); ns = no significativo.

Las diferencias productivas del garbanzo entre ciclos se deben principalmente a la cantidad de lluvia registrada en cada ciclo. La precipitación registrada previo a la siembra del ciclo otoño - invierno 2019 - 2020 (Figura 1), pudo incrementar la cantidad de insectos plaga en el cultivo, teniendo un efecto de reducción significativa sobre el rendimiento, debido a que, en ambos ciclos, no se realizó la aplicación de productos químicos para su control. En este sentido, algunos autores mencionan que el potencial del garbanzo no se ha alcanzado debido a la inestabilidad de las variaciones anuales en precipitación, temperatura y enfermedades (Morales *et al.*, 1997; Padilla *et al.*, 2008). En lo que respecta al comportamiento entre genotipos, la variedad El Patrón superó los rendimientos biológicos de forraje de todos ellos. Este rendimiento se debe a que es el genotipo que se reporta con el mayor porte, número de ramas y a que, probablemente, se adapta mejor a las condiciones de clima y suelo de la región.

**Tabla 2.** Respuesta productiva promedio (DS) de los genotipos de garbanzo *Desi* evaluados en los ciclos 2018 - 2019 y 2019 - 2020.

**Table 2.** Average productive response (SD) of the *Desi* chickpea genotypes evaluated in the 2018 - 2019 and 2019 - 2020 cycles.

Variable	Ciclo de siembra		DEC
	2018 - 2019	2019 - 2020	
Rendimiento biológico (t ha <sup>-1</sup> )	13.95 (1.3) <sup>a</sup>	11.68 (1.6) <sup>b</sup>	2.27
Rendimiento de grano (t ha <sup>-1</sup> )	4.29 (0.4) <sup>a</sup>	3.21 (0.6) <sup>b</sup>	1.08
Índice de cosecha (%)	30.89 (3.7) <sup>a</sup>	27.75 (5.0) <sup>b</sup>	3.89
Rendimiento de esquilmos (t ha <sup>-1</sup> )	9.67 (1.2) <sup>a</sup>	8.47 (1.5) <sup>b</sup>	1.20

a, b = diferentes literales entre columnas indican diferencia significativa, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ); DEC = diferencia entre ciclos; Valores entre paréntesis indican la desviación estándar.



**Tabla 3.** Comparación de medias (DS) del rendimiento biológico, de grano, de esquilmos ( $t\ ha^{-1}$ ), unidad animal (mes) e índice de cosecha (%) entre genotipos de garbanzo *Desi* del promedio de los ciclos agrícolas otoño-invierno de 2018 – 2019 y 2019 – 2020.

**Table 3.** Comparison of means (SD) for biological yield, grain, harvest ( $t\ ha^{-1}$ ), animal unit (month) and harvest index (%) between *Desi* chickpea genotypes of the average of the autumn-winter agricultural cycles of 2018 – 2019 and 2019 – 2020.

Genotipo	Rendimiento biológico	Animales (n)	Rendimiento de grano	Índice de cosecha	Rendimiento de esquilmos	Animales (n)
El Patrón	14.21 (2.0) <sup>a</sup>	35	3.48 (0.9) <sup>a</sup>	24.16 (3.8) <sup>b</sup>	10.73 (1.2) <sup>a</sup>	27
Lerma	11.71 (1.4) <sup>c</sup>	29	3.83 (0.6) <sup>a</sup>	32.60 (2.5) <sup>a</sup>	7.88 (0.9) <sup>c</sup>	20
Pénjamo	12.21 (1.7) <sup>bc</sup>	30	3.84 (0.4) <sup>a</sup>	31.72 (3.5) <sup>a</sup>	8.37 (1.5) <sup>bc</sup>	21
San Antonio 05	12.68 (1.8) <sup>bc</sup>	31	3.73 (1.1) <sup>a</sup>	28.90 (5.5) <sup>a</sup>	8.96 (0.9) <sup>bc</sup>	22
ICC - 1273	13.26 (1.4) <sup>ab</sup>	33	3.87 (0.6) <sup>a</sup>	29.22 (2.7) <sup>a</sup>	9.38 (1.1) <sup>b</sup>	23

abc = diferentes literales entre filas indican diferencia significativa, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ); Valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

### Rendimiento de forraje

Los genotipos con el mayor rendimiento forrajero presentaron el menor índice de cosecha, lo que indica su alto potencial de rendimiento biológico. Los datos reportados por Gutiérrez *et al.* (2017) y Soltero y Pérez (2006), muestran un mayor índice de cosecha en las variedades El Patrón, Pénjamo y San Antonio 05 a los observados en las mismas variedades evaluadas en el presente estudio. Esto se debe a que la cantidad de forraje no modifica el rendimiento de grano, pero sí el índice de cosecha, debido a la correlación negativa existente entre éste con el rendimiento biológico y de esquilmos.

### Rendimiento biológico de grano

El rendimiento de grano no fue diferente entre los genotipos, lo cual coincide con lo documentado por otros autores, quienes mencionan que los rendimientos del garbanzo tipo *Desi*, que se siembran en regiones áridas, durante el otoño y condiciones de riego, pueden ser de  $3.5\ t\ ha^{-1}$  (Iliadis, 2001). Soltero y Pérez (2006) reportaron que la variedad San Antonio 05 presenta rendimientos de entre  $2.4$  a  $3.5\ t\ ha^{-1}$  bajo condiciones de riego. Por su parte, Gutiérrez *et al.* (2017) observaron, en la misma localidad de prueba, rendimientos inferiores ( $2.6\ t\ ha^{-1}$ ) para las variedades El Patrón y Pénjamo, a los observados en el presente estudio, con la diferencia de que ellos sembraron en surcos a doble hilera y en el presente, en surco sencillo.

### Rendimiento de esquilmos

Los rendimientos de esquilmos observados fueron mayores a los reportados por Kafizadeh y Maleki (2012), quienes mencionan que la paja de garbanzo que queda después de la trilla del grano, suele ser igual o superior al rendimiento de la semilla. Por su parte, Soltero y Pérez (2006) reportaron rendimientos de esquilmos entre  $5$  y  $7\ t\ ha^{-1}$ , rendimientos por debajo a los reportados en el presente estudio. El aporte de esquilmos de garbanzo en México está dado principalmente por el tipo *kabuli*, que, por dejarse secar en el suelo, pierde todas las hojas antes de su trilla, por lo que el esquilmo que queda se compone principalmente de ramas y cáscaras de las vainas.

En general, los materiales evaluados bajo las condiciones del presente estudio muestran rendimientos de grano y

forraje que pueden ser complemento importante de la dieta de animales, principalmente en las zonas áridas donde la disponibilidad y cantidad de alimento es limitado y donde este recurso alimenticio muestra altos rendimientos de grano y esquilmos.

### Características de calidad

**Contenido de nutrientes.** Para el análisis bromatológico del grano, se observó que el contenido de materia seca osciló entre 91 a 92 %. Las variedades El Patrón, Pénjamo y Lerma presentaron similar contenido de proteína cruda y proteína digestible. El contenido de NIDA fue diferente entre genotipos. La variedad San Antonio 05 presentó el mayor contenido de PC, PD y el más bajo contenido NIDA, CNE y TND. La línea ICC-1273 presentó el menor contenido de PC, FDN y FDA, pero el mayor de NIDA, EE, L, CNE, TND, DMS, CMS, ENI, ENm y ENg. La variedad Lerma presentó, junto a ICC-1273, el mayor contenido de L y EE. Pénjamo y San Antonio 05 presentaron el mayor contenido de FDA y FDN (Tabla 4).

**Contenido de PC.** La semilla de garbanzo es una buena fuente de proteína (Illg *et al.*, 1987), proteína que se considera de reserva (Roy *et al.*, 2010) y que, gracias a sus péptidos bioactivos de bajo peso molecular, se pueden utilizar como terapias alternativas para ciertas enfermedades relacionadas a la inflamación crónica (Juárez-Chairez *et al.*, 2022). El contenido de esta fracción, en los genotipos evaluados en el presente estudio coincide con los datos que Wood y Grusak (2007) reportan para la semilla de garbanzo tipo *Desi* (16.7 % a 30.6 %), por lo que cualquiera de los genotipos aquí evaluados puede ser utilizado como ingrediente que aporte a los requerimientos de proteína en las etapas de mantenimiento (8 %) (Van Soest, 1994) y crecimiento (9 – 16 %) de bovinos (NRC, 2000). Dicho aporte dependerá del nivel de inclusión en la dieta.

**Contenido de EE.** En general, el garbanzo presenta menor contenido de grasa que otras leguminosas (Singh, 1985; Gül *et al.*, 2008). El valor de grasa aquí reportado (3 a 4 %) se encuentra entre los rangos observados por Wood y Grusak (2007) para los garbanzos tipo *Desi*, que indican es del 2.9 a 7.4 %.

**Contenido de FDN.** Se reporta que los garbanzos *Desi* tienen una cubierta de semilla más gruesa que los tipos *Kabuli*, lo que se refleja en el mayor contenido de fibra (Knights y Mai-

ler, 1989). La alta concentración de fibra (FDN) que pueden resultar en efectos negativos sobre el consumo (Chalupa *et al.*, 1996; Espinoza-Canales *et al.*, 2017), por lo que la combinación del grano de garbanzo con otros ingredientes resulta atractiva, debido al bajo porcentaje de fibras que presentan los genotipos aquí evaluados, ya que el NRC (2001) indica que las raciones para ganado lechero deben contener de 19 a 27 % de FDA. Hadsell y Sommerfeldt (1988), observaron que una tasa óptima de incorporación dietética de bovinos leche es cercana al 50 % durante la lactancia temprana, siendo la ingesta de grasas el mayor beneficio, aunque argumentan y sugieren en la necesidad de hacer más estudios.

**Contenido de FDA.** Por otra parte, la FDA se correlaciona de manera negativa con la digestibilidad de los alimentos (Harris, 1993), siendo esta fracción utilizada para estimar el contenido de energía de los mismos (Donker, 1989). Para el presente estudio, se pudo observar que en el análisis de preferencia (Figura 2) corrobora lo mencionado por dichos autores, siendo el genotipo ICC-1273 el de menor concentración de fibras y debido a ello el de mejor aporte de energía (mantenimiento, lactancia y ganancia), digestibilidad, consumo de materia seca y total de nutrientes digestibles; fracciones que han sido usados como indicadores para estimar el comportamiento productivo del ganado (Espinoza-Canales *et al.*, 2017). En general, el contenido de FDA fue bajo para todos los genotipos evaluados.

**Contenido de PD.** En general, se ha reportado que la digestibilidad de la proteína del garbanzo tipo Kabuli es mayor que la proteína del tipo Desi (Paredes-López *et al.*, 1991; Sánchez-Vioque *et al.*, 1999). Fracción que puede mejorar si la semilla recibe un tratamiento especial (Bampidis y Christodoulou, 2011), principalmente cuando se utiliza en alimentación de no rumiantes (Domoney, 1999).

**Contenido de energía (ENm, Eng y ENI).** Una vaca lechera en crecimiento moderado de 700g d<sup>-1</sup> requiere de 6.9 a 7.5 Mcal d<sup>-1</sup> de ENm y de 2.5 a 3.1 Mcal d<sup>-1</sup> de ENg (NRC, 2001), por lo que en una dieta con 50 % grano y 50 % forraje, teniendo como única fuente el grano de cualquier variedad es suficiente para alcanzar este nivel de producción, sin embargo una vaca lechera de 450 kg de peso vivo con una producción de leche de 25 kg d<sup>-1</sup> requiere una concentración de 1.9 a 2.3 Mcal Kg<sup>-1</sup> de ENI (NRC, 2001), mientras que los granos evaluados tienen una concentración energética cercana al límite inferior para este nivel de producción.

**Contenido de minerales.** El contenido de cenizas fue similar entre genotipos. Respecto al K<sup>+</sup>, fue el mineral encontrado en mayor proporción (1.3 – 1.4 %) y el Na<sup>+</sup>, en menor cantidad (Tabla 5).

**Contenido de macrominerales.** El NRC (2000) menciona que los principales macrominerales requeridos por los rumiantes son el Ca<sup>2+</sup> (0.21 – 0.30 %), P<sup>5+</sup> (0.15 – 0.19 %), Mg<sup>2+</sup> (0.12 - 0.20 %), K<sup>+</sup> (0.60 – 0.70 %), Na<sup>+</sup> (0.06 – 0.10 %) y S<sup>2-</sup> (0.15 %). Al respecto, los aportes observados por los genotipos evaluados

**Tabla 4.** Valor nutrimental (DS) del grano de cinco genotipos de garbanzo *Desi*.

**Table 4.** Grain nutritional value (SD) of five *Desi* chickpea genotypes.

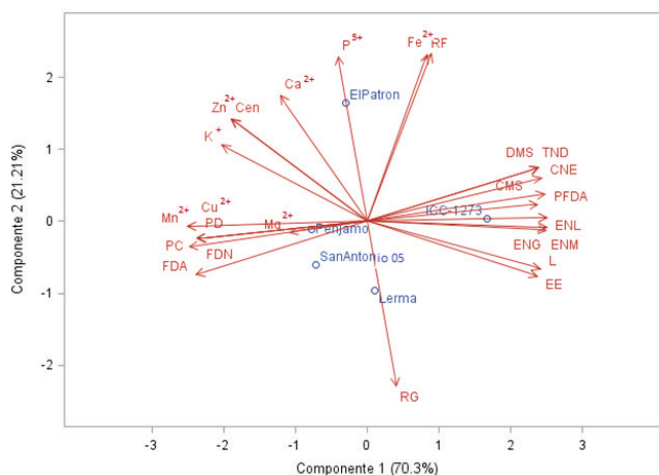
Variable	Unidad	El Patrón	Lerma	Pénjamo	SA 05	ICC-1273
MS	%	91.97 (0.5) <sup>a</sup>	91.77 (0.5) <sup>a</sup>	91.92 (0.5) <sup>a</sup>	92.14 (0.6) <sup>a</sup>	92.16 (0.5) <sup>a</sup>
PC	%	23.25 (0.3) <sup>b</sup>	23.25 (0.3) <sup>b</sup>	23.08 (0.5) <sup>b</sup>	24.04 (0.4) <sup>a</sup>	21.55 (0.3) <sup>c</sup>
PD	%	17.34 (0.3) <sup>b</sup>	17.34 (0.5) <sup>b</sup>	17.19 (0.5) <sup>b</sup>	18.6 (0.3) <sup>a</sup>	15.80 (0.3) <sup>c</sup>
NID <sup>A</sup>	%	0.24 (0.01) <sup>b</sup>	0.22 (0.01) <sup>b,c</sup>	0.27 (0.03) <sup>b</sup>	0.20 (0.01) <sup>c</sup>	0.35 (0.03) <sup>a</sup>
Grasa (EE)	%	3.71 (0.2) <sup>b</sup>	4.04 (0.2) <sup>a</sup>	3.86 (0.05) <sup>b</sup>	3.84 (0.05) <sup>b</sup>	4.18 (0.2) <sup>a</sup>
FDA	%	12.15 (0.4) <sup>b</sup>	12.89 (0.3) <sup>b</sup>	13.51 (0.3) <sup>a</sup>	13.11 (0.3) <sup>a,b</sup>	11.41 (0.2) <sup>c</sup>
FDN	%	13.95 (0.5) <sup>b</sup>	13.92 (0.5) <sup>b</sup>	15.72 (0.5) <sup>a</sup>	15.64 (0.5) <sup>a</sup>	12.57 (0.5) <sup>c</sup>
CNE	%	55.34 (0.5) <sup>b</sup>	55.22 (0.6) <sup>b</sup>	53.78 (0.5) <sup>c</sup>	52.74 (0.5) <sup>c</sup>	58.11 (0.5) <sup>a</sup>
TND	%	81.02 (0.5) <sup>a</sup>	80.25 (0.7) <sup>a,b</sup>	79.61 (0.5) <sup>b</sup>	80.03 (0.5) <sup>a</sup>	81.78 (0.5) <sup>a</sup>
L	%	0.01 (0.01) <sup>c</sup>	0.12 (0.01) <sup>a</sup>	0.01 (0.01) <sup>c</sup>	0.09 (0.01) <sup>b</sup>	0.13 (0.01) <sup>a</sup>
ENI	Mcal/kg	1.88 (0.2) <sup>a</sup>	1.89 (0.2) <sup>a</sup>	1.87 (0.2) <sup>a</sup>	1.87 (0.2) <sup>a</sup>	1.91 (0.2) <sup>a</sup>
ENm	Mcal/kg	2.43 (0.1) <sup>a</sup>	2.45 (0.1) <sup>a</sup>	2.42 (0.1) <sup>a</sup>	2.42 (0.1) <sup>a</sup>	2.47 (0.1) <sup>a</sup>
ENg	Mcal/kg	1.71 (0.05) <sup>a</sup>	1.73 (0.05) <sup>a</sup>	1.7 (0.05) <sup>a</sup>	1.7 (0.05) <sup>a</sup>	1.74 (0.05) <sup>a</sup>
DMS	%	79.44 (0.5) <sup>a</sup>	78.86 (0.5) <sup>b</sup>	78.38 (0.5) <sup>b</sup>	78.69 (0.5) <sup>b</sup>	80.01 (0.5) <sup>a</sup>
CMS	% PV	8.60 (0.5) <sup>b</sup>	8.62 (0.5) <sup>b</sup>	7.73 (0.5) <sup>c</sup>	7.67 (0.5) <sup>c</sup>	9.55 (0.5) <sup>a</sup>

abc = diferentes literales entre columnas indican diferencia significativa, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ); PC proteína cruda; PD proteína digestible; PIDA proteína insoluble en detergente ácido; PIDN = proteína insoluble en detergente neutro; EE extracto etéreo; FDA = fibra detergente ácida; FDN= fibra detergente neutro; CNE = carbohidratos no estructurales; TND = total de nutrientes digestibles; L = lignina; ENL= energía neta de lactancia; ENM = energía neta de mantenimiento; ENG = energía neta de ganancia; DMS = digestibilidad de la materia seca; CMS = consumo de materia seca; PV = peso vivo; SA 05 = San Antonio 05. Valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

en este estudio indican que un kilogramo de garbanzo *Desi* cubre los requerimientos de  $Mg^{2+}$ ,  $P^{5+}$  y  $K^+$ .

**Contenido de microminerales.** Los materiales evaluados tienen un aporte importante de  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y, principalmente, de  $Fe^{2+}$  a los requeridos por rumiantes (NRC, 2000). Se ha observado que estos minerales son marginales a deficientes en ciertos forrajes nativos de zonas áridas (Ramírez-Orduña *et al.*, 2005; 2008), mientras que los pastos tienen un aporte importante de  $Ca^{2+}$  y  $P^{5+}$ , pero su alto contenido de lignina reduce la utilización de estos (Reyes-Pérez *et al.*, 2022), por lo que la inclusión de garbanzo en la dieta de este alimento en bovinos que pastorean libremente es importante. Wang y Daun (2004) observaron que la semilla de garbanzo cruda (100 g) proporciona en promedio alrededor de 5.0 mg/100 g de  $Fe^{2+}$ , 4.1 mg/100 g de  $Zn^{2+}$ , 138 mg/100 g de  $Mg^{2+}$  y 160 mg/100 g de  $Ca^{2+}$  (Jukanti *et al.*, 2012) siendo, este último, mayor en los tipos *Desi* que en los *Kabuli*.

**Análisis de preferencia.** Jacinto-Pimienta *et al.* (2016), mencionan que, puesto que el análisis MDPREF se basa en un modelo de componentes principales, el biplot, que es una representación gráfica que muestra la relación entre los datos de la matriz (las columnas y las filas), las dimensiones del biplot son los dos primeros componentes (Figura 2). El primer componente es aquel que tiene una mayor dimensión del biplot, es la característica de producción y calidad. El segundo componente es ortogonal al primero, siendo el segundo más preferido. En el biplot, se muestran puntos que observan los genotipos y cada valor de producción y calidad por un vector. Los puntos que están estrechamente agrupados en una región del gráfico representan los genotipos que tienen los mismos patrones de preferencia a través de las variables de producción y calidad. Los vectores que apuntan en más o menos la misma dirección representan los valores de producción y calidad que tienen patrones similares.



**Figura 2.** Representación gráfica del análisis de preferencia multidimensional de la relación entre genotipos y características de rendimiento y calidad. Cen = Cenizas, RF= Rendimiento de forraje, DMS = Materia Seca digestible, TND = Total de nutrientes digestibles, CNE = Carbohidratos no estructurales, CMS = Consumo de materia seca, PFDA = Proteína en la fibra detergente ácido, ENL= Energía neta en leche, ENG = Energía neta de ganancia, ENM = Energía neta de mantenimiento, L = Lignina, EE= Extracto etéreo, FDA = Fibra detergente ácido, FDN = Fibra detergente neutro, PC = Proteína cruda, PD = Proteína digestible.

**Figure 2.** Graphical representation of the multidimensional preference analysis of the relationship between genotypes and yield and quality characteristics. Cen = Ash, RF = Forage yield, DMS= Digestible dry matter, TND = Digestible total de nutrients, CNE = Non-structural carbohydrates, CMS = Dry matter intake, PFDA = Protein in acid detergent fiber, ENL= Net energy in milk, ENG = Gain net energy, ENM = Maintenance net energy, L = Lignin, EE = Eter extract, FDA = Acid detergent fiber, FDN = Neutral detergent fiber, PC = Crude Protein, PD = Digestible Protein.

Dos componentes explicaron el 91.51 % de la variación total (Figura 2). La representación gráfica muestra que el mayor rendimiento de forraje y minerales se encuentran preferentemente en el genotipo El Patrón. Por su parte la DMS, CNE, TND, CMS, EE, NIDA y contenidos de energía (lac-

**Tabla 5.** Concentración mineral (DS) del grano de cinco genotipos de garbanzo *Desi*.

**Table 5.** Grain mineral concentration (SD) of five *Desi* chickpea genotypes.

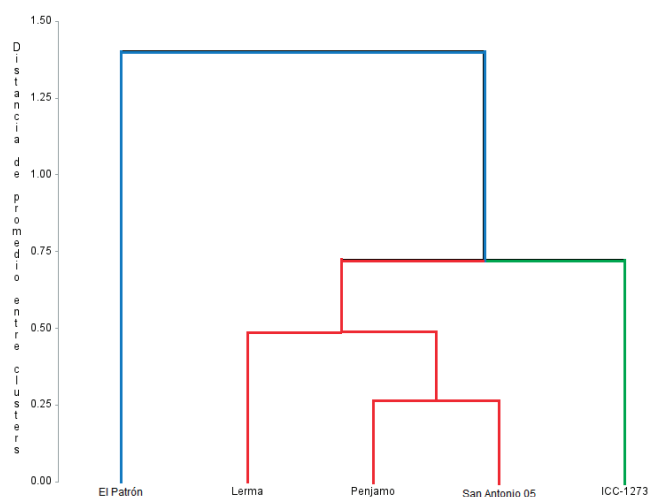
Mineral	Unidad	El Patrón	Lerma	Pénjamo	SA 05	ICC-1273
Cenizas	%	3.75 (0.5) <sup>a</sup>	3.57 (0.5) <sup>a</sup>	3.76 (0.5) <sup>a</sup>	3.74 (0.5) <sup>a</sup>	3.59 (0.5) <sup>a</sup>
Ca <sup>2+</sup>	%	0.17 (0.1) <sup>a</sup>	0.14 (0.1) <sup>bc</sup>	0.17 (0.1) <sup>a</sup>	0.14 (0.1) <sup>bc</sup>	0.15 (0.1) <sup>b</sup>
P <sup>5+</sup>	%	0.49 (0.01) <sup>a</sup>	0.46 (0.01) <sup>b</sup>	0.45 (0.01) <sup>b</sup>	0.45 (0.01) <sup>b</sup>	0.44 (0.01) <sup>b</sup>
Mg <sup>2+</sup>	%	0.15 (0.01) <sup>b</sup>	0.15 (0.01) <sup>b</sup>	0.16 (0.01) <sup>a</sup>	0.15 (0.01) <sup>b</sup>	0.15 (0.01) <sup>b</sup>
K <sup>+</sup>	%	1.37 (0.07) <sup>a</sup>	1.35 (0.07) <sup>a</sup>	1.40 (0.07) <sup>a</sup>	1.44 (0.07) <sup>a</sup>	1.35 (0.07) <sup>a</sup>
Na <sup>+</sup>	%	0.03 (0.001) <sup>a</sup>	0.03 (0.001) <sup>a</sup>	0.03 (0.001) <sup>a</sup>	0.03 (0.001) <sup>a</sup>	0.03 (0.001) <sup>a</sup>
Zn <sup>2+</sup>	mg/kg	21.89 (0.5) <sup>a</sup>	17.57 (0.5) <sup>c</sup>	22.97 (0.5) <sup>a</sup>	21.07 (0.5) <sup>a,b</sup>	19.41 (0.5) <sup>b</sup>
Mn <sup>2+</sup>	mg/kg	30.39 (0.5) <sup>a</sup>	29.49 (0.5) <sup>a,b</sup>	31.08 (0.5) <sup>a</sup>	31.38 (0.5) <sup>a</sup>	27.37 (0.5) <sup>b</sup>
Cu <sup>2+</sup>	mg/kg	7.27 (0.5) <sup>a</sup>	7.48 (0.5) <sup>a</sup>	6.53 (0.5) <sup>b</sup>	7.56 (0.5) <sup>a</sup>	6.08 (0.5) <sup>b</sup>
Fe <sup>2+</sup>	mg/kg	77.20 (0.5) <sup>a</sup>	60.40 (1.5) <sup>b</sup>	60.70 (1.9) <sup>b</sup>	59.70 (1.6) <sup>b</sup>	63.60 (1.0) <sup>b</sup>

abc = diferentes literales entre columnas indican diferencia significativa, según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ); C = cenizas; Ca<sup>2+</sup> = calcio; P<sup>5+</sup> = fósforo; Mg<sup>2+</sup> = magnesio; K<sup>+</sup> = potasio; Na<sup>+</sup> = sodio; Zn<sup>2+</sup> = zinc; Mn<sup>2+</sup> = manganeso; Cu<sup>2+</sup> = cobre; Fe<sup>2+</sup> = hierro; Valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

tancia, mantenimiento y ganancia), se encuentran preferentemente en la línea experimental ICC-1273. Las variables RG, PC, PD, FDA, FDN y los minerales Mg, Mn y Cu se encuentran, preferentemente, en los genotipos Lerma, San Antonio 05 y Pénjamo.

Diversos estudios han encontrado que los procedimientos de análisis de componentes principales y de conglomerados son eficientes para evaluar la diversidad genética de los rasgos agro-morfológicos en garbanzos (Gupta *et al.*, 2011; Kayan y Adak, 2012; Parameshwarappa *et al.*, 2011). Los resultados de los genotipos evaluados en el presente estudio con la utilización de ambos procedimientos, considerando características productivas y de calidad, permitió agrupar de una manera clara la diversidad genética de los materiales evaluados. Dicha diversidad determina su potencial para mejorar la eficiencia y, por lo tanto, su uso para la reproducción, que eventualmente puede resultar en una mejor producción de alimentos (Malik *et al.*, 2014), características a considerar en la producción animal, principalmente como una alternativa forrajera más, en siembras de otoño - invierno, como lo sugieren Ochoa-Espinoza *et al.* (2022).

Considerando las variables de rendimiento de forraje (RF), rendimiento de grano (RG) y calidad nutricional, se construyó el dendograma de la Figura 3. Los genotipos se separaron en tres grupos, uno integró a los genotipos Lerma, Pénjamo y San Antonio 05; otro, a la línea ICC-1273; el tercero, a la variedad El Patrón, que fue la que presentó la mayor distancia de promedio entre grupos. En este caso, los resultados de este análisis en el presente estudio sugieren el cruzamiento directo entre las variedades El Patrón y la línea ICC-1273 con el objetivo de desarrollar materiales superiores en características de rendimiento y calidad forrajera.



**Figura 3.** Dendrograma que representa la relación genética de cinco genotipos de garbanzo *Desi* basado en 26 rasgos cuantitativos.

**Figure 3.** Dendrogram representing the genetic relationship of five *Desi* chickpea genotypes based on 26 quantitative traits.

## CONCLUSIONES

Los cinco genotipos de garbanzo forrajero presentaron rendimientos de grano similares, sin embargo, la variedad El Patrón presentó el mayor rendimiento biológico, rendimiento de esquilmos y en consecuencia mayor capacidad para alimentar UA. La variedad San Antonio 05 presentó el mayor contenido de proteína cruda, y aunque la línea experimental ICC-1273 presentó el nivel más bajo, el análisis de preferencia por componentes principales mostró que fue el genotipo de mayor DMS, CNE, TND, CMS, EE, NIDA, ENI, ENm y Eng; características que la hacen la variedad con grano y forraje de mayor valor nutricional. Se observó un contenido importante de minerales, principalmente de K. En general, los resultados muestran que, tanto en rendimiento como en calidad, los genotipos de garbanzo *Desi* pueden servir como una fuente importante de forraje y nutrientes en la alimentación animal.

## LITERATURA CITADA

- ANKOM. 2005. Acid detergent fiber in feeds. Filter bag technique (ANKOM200). Ankom Technology 2005; Macedon, NY, USA: Ankom Technology Corp. [Consultado 10 enero 2022]. Disponible en: [www.ankom.com/09procedures/ADF%20Method%20A200.pdf](http://www.ankom.com/09procedures/ADF%20Method%20A200.pdf).
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15 th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Bampidis, V.A. y Christodoulou, V. 2011. Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 168: 1-20.
- Chalupa, W., Galligan, D.T. y Ferguson, J.D. 1996. Animal nutrition in the XXI century. *Animal Feed Science and Technology*. 58:1-18.
- Chavan, J.K., Kadam, S.S. y Salunkhe, D.K. 1989. Chickpea. In: CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization, vol. I. Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (ed.), pp. 247-288. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA
- CONAGUA. Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero santo Domingo (0306), Estado de Baja California Sur. [Consultado enero 2022]. 2018. Disponible en: [https://sigagis.conagua.gob.mx/gas1/Edos\\_Acuiferos\\_18/BajaCaliforniaSur/DR\\_0306.pdf](https://sigagis.conagua.gob.mx/gas1/Edos_Acuiferos_18/BajaCaliforniaSur/DR_0306.pdf)
- COTECOCA, 1975. Coeficientes de agostadero de la República Mexicana: Estado de Baja California, Sur. Secretaría de Agricultura y Ganadería, México, p. 67.
- Díaz-Romeau, R.A., Hunter, P. 1988. Methodology for Sampling Soils and Tissues. CATIE, Turrialba, Costa Rica, Mimeo no. 1, pp. 26-28.
- Domoney, C. 1999. Inhibitor of legume seeds. In Seed protein, PR Shewry and R Casey, (ed.), pp. 635-655. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.
- Donker, J. 1989. Improved energy prediction equations for dairy cattle rations. *Journal of Dairy Science* 67:427-436.
- Echevarría-Hernández, A., Wong-Corral, F., Borboa-Flores, J., Rodríguez-Félix, F., Del Toro-Sánchez, C.L., García-Hernández, J.L. y Rueda Puente, E.O. 2021. Fertilization systems in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in soils of arid-desertic areas. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 24(2).



- Espinoza-Canales, A., Gutiérrez-Bañuelos, H., Sánchez-Gutiérrez, R. A., Muro-Reyes, A., Gutiérrez-Piña, F. J. y Corral-Luna, A. 2017. Calidad de forraje de canola (*Brassica napus* L.) en floraciones temprana y tardía bajo condiciones de temporal en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8: 243-248.
- Goering, H.K. y Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses. Apparatus, reagents, procedures, and some applications. *Agricultural Handbook*.
- Gómez, J.D., Monterroso, A.I., Toledo, M.L. y Tinoco, J.A. 2008. Sector Ganadero [en línea]. Universidad Nacional Autónoma de México. [Consultado febrero 2022]. Disponible en: [http://www.atmosfera.unam.mx/gcclimatico/documentos/reportes\\_cuarta\\_comunicacion/Ganadero/Ganadero%201/Informe\\_final\\_del\\_sector\\_ganadero.pdf](http://www.atmosfera.unam.mx/gcclimatico/documentos/reportes_cuarta_comunicacion/Ganadero/Ganadero%201/Informe_final_del_sector_ganadero.pdf)
- Gül, M.K., Ömer, E.C. y Turhan, H. 2008. The effect of planting time in fatty acids and tocopherols in chickpea. *European Food Research and Technology*. 226: 517-522.
- Gupta, D., Sharma, H.C., Pathania, P., Pande, S., Clements, L. y Bala, I. 2011. Evaluation of cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) for agro morphological traits and resistance to rust in Northwestern Indian Himalaya. *Plant Diseases Research* 26: p. 171.
- Gutiérrez, P.E., Melgoza, V.C.M., Avalos, C.R., Cota, B.C.I., Fierros, L.G.A., Ortega, M.P.F. y Navejas, J.J. 2017. Evaluación de dos variedades de garbanzo forrajero y un fertilizante foliar orgánico en tres fechas de siembra. V Simposio Nacional de Garbanzo. INIFAP. Hermosillo, Sonora. México. 5: 76-80.
- Hadsell, D.L. y Sommerfeldt, J.L. 1988. Chickpeas as a protein and energy supplement for high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 71: 762-772.
- Harris, B. 1993. Value of high-fiber alternative feedstuffs as extenders of roughage sources: [Consultado enero 2022]. disponible en: [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/feeding/VALUE\\_OF\\_HIGH-FIBER\\_ALTERNATIVE\\_FEEDSTUFFS.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/feeding/VALUE_OF_HIGH-FIBER_ALTERNATIVE_FEEDSTUFFS.html)
- Iliadis, C. 2001. Evaluation of six chickpea varieties for seed yield under autumn and spring sowing. *Journal of Agricultural Science*. 137: 439-444.
- Jacinto-Pimienta, S.Y., Mendoza-Hernández, J.H.R., Zaldivar-Cruz, J.M., Sol-Sánchez, Á., Vargas-Villamil, L.M., y Reyes-Sánchez, C.A. 2016. El uso de componentes principales en la clasificación melisopalínológica de la miel de *Apis mellifera* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(SPE14), 2831-2840.
- Juárez-Chairez, M.F., Meza-Márquez, O.G., Márquez-Flores, Y.K., Jiménez-Martínez, C. y Osorio-Revilla, G. 2022. In vitro anti-inflammatory and antioxidant activity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) proteins hydrolysate fractions. *Biotecnia*. 24 (2): 59-68.
- Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L. y Chibbar, R.N. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*. 108(S1), S11-S26.
- Kafilzadeh, F. y Maleki, E. 2012. Chemical composition, in vitro digestibility and gas production of straws from different varieties and accessions of chickpea. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 96(1), 111-118.
- Kayan, N. y Adak, M.S. 2012. Associations of some characters with grain yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pakistan Journal of Botanic*. 44: 267-272.
- Knights, E.J. y Mailer, R.J. 1989. Association of seed type and colour with establishment, yield and seed quality in chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Agricultural Science*. 113, 325-330.
- Kohashi, S.J., da Costa, J.C. y Miranda, S.C. 1980. Harvest index in *Phaseolus vulgaris* (L.). *Annual Report of Bean Improvement Cooperative* 23:87-89.
- Illg, D. J., Sommerfeldt, J.L. y Boe, A.A. 1987. Chickpeas as a substitute for corn and soybean meal in growing heifer diets. *Journal of Dairy Science*. 70: 2181.
- López, A.L.M., Armenta, L.C., Armenta, B.A.D., Fraga, P.H.C. y Félix, H.J.A. 2013. Localización de zonas aptas para la agricultura protegida en Baja California Sur, México. *Agronomía Mesoamericana*. 24(2):401-409.
- Malik, S.R., Shabbir, G., Zubir, M., Iqbal, S.M. y Ali, A. 2014. Genetic diversity analysis of morphogenetic traits in Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Agriculture and Biology*. 16: 956-960.
- Mancera, M.G. 2011. Desertificación de Cuencas Agrícolas en Baja California Sur. Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Agricultura Sustentable). Disertación Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S.
- Moore, J.E. y Undersander, J. 2002. Relative forage quality: An alternative to relative feed value and quality index. *Proceeding 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*. 32:16-29.
- Morales, G.J.A., Ortega, M.P.F., Fu, A.A. y Grageda, G.G.J. 1997. Guía Técnica para Producir Garbanzo en la Costa de Hermosillo. Folleto para productores No.16, SAGAR-INIFAP-CIRNO. CECH, Hermosillo, Sonora, México.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th Rev. ed. National Research Council. National Academy of Science. Washington, DC.
- NRC. 2000. Nutrient requirements of beef cattle. 7th Rev. Ed. National Research Council. National Academy of Science Washington, D.C.
- Ochoa-Espinoza, X.M., Reta-Sánchez, D.G., Cano-Ríos, P., Sánchez-Duarte, J.I., Ochoa-Martínez, E., García-Martínez, J.E., Reyes-González, A. y Quiroga-Garza, H.M. 2022. Rendimiento y valor nutritivo de cereales y cártamo forrajero en la Comarca Lagunera. *Biotecnia* 24(2): 142-148.
- Padilla, V.I., Valenzuela, V.R., Armenta, C.C.M., Salinas, P.R.A. y Sánchez, S.E. 2008. Comportamiento agronómico de genotipos de garbanzo en siembra tardía en el Valle del Mayo, Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31 (1): 43-49.
- Parameshwarappa, S.G., Salimath, P.M., Upadhyaya, H.D., Patil, S.S. y Kajjdoni, S.T. 2011. Genetic divergence under three environments in a minicore collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Indian Journal of Plant Genetic Research*. 24: 177-185.
- Paredes-López, O., Ordorica-Falomir, C. y Olivares-Vázquez, M.R. 1991. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *Journal of Food Science*. 56: 726-729.
- Ramírez-Orduña, R., Ramírez, R. G., González-Rodríguez, H. y Haenlein, G.F.W. 2005. Mineral content of browse species from Baja California Sur, Mexico. *Small Ruminant Research*. 57(1), 1-10.

- Ramírez-Orduña, R., Ramírez, R. G., Romero-Vadillo, E., González-Rodríguez, H., Armenta-Quintana, J. A. y Avalos-Castro, R. 2008. Diet and nutrition of range goats on a sarcocaulous shrubland from Baja California Sur, Mexico. *Small Ruminant Research*. 76(3), 166-176.
- Reyes-Pérez, J.J., Méndez-Martínez, Y., Espinosa-Cunhuay, K.A., Bastidas-Espinoza, R.L., Apolo-Bosquez, J.A., Ramírez de la Ribera, J.L. y Ruiz-Espinoza, F.H. 2022. Composición química, digestibilidad y rendimiento de *Brachiaria decumbens* a diferentes edades de rebrote. *Biotecnia*. 24 (2): 84-93.
- Roy, F., Boye, I.J. y Simpson, B.K. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: pea, chickpea and lentil. *Food Research International*. 43: 432-442.
- Salako, A.E. 2006. Application of morphological indices in the assessment of type and function in sheep. *International Journal of Morphology*. 24(1): 13-18.
- Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J. y Millán, F. 1999. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*. 64: 237-243.
- SAS. 2014. SAS – Statistical Analysis Software for windows ver. 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Singh, U. 1985. Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.): current status and future research needs. *Plant Foods for Human Nutrition*. 35: 339-351.
- Soltero, D.L. y Pérez, V.J.J. 2006. Guía para producir garbanzo forrajero de riego en la Ciénega de Chapala. INIFAP-CIRPAC, C.E. Centros-altos de Jalisco, Jalisco. Folleto para productores núm. 2. p.22.
- Soltero-Díaz, L.; Andrade-Arias, E.; Grageda-Cabrera, O. A. y Pérez Valdez, J. J. 2008. San Antonio 05, variedad de garbanzo forrajero para la región Ciénega de Chapala, México. *Agricultura técnica en México*, 34(2), 263-265. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60834214>
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Ithaca, NY; Comstock, Cornell University Press.
- Wang, N. y Daun, J.K. 2004. The chemical composition and nutritive value of canadian pulses. *Canadian Grain Commission Report*, 19-29.
- Wood, J.A. y Grusak, M.A. 2007. Nutritional value of chickpea. Chickpea. In: Yadav, S.S., Redden, B., Chen, W. y Sharma, B., Eds., *Chickpea Breeding and Management*, CAB International, Wallingford, 101-142.